

Produção de cerveja: Utilização de estirpes não-convencionais em co-fermentação com *Saccharomyces* para potenciação do perfil sensorial de diversos tipos de cerveja.

Manuel Mântua Esteves Garcia

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Processamento de Alimentos

Orientador: Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação no Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar no Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

“Beer is proof that god loves us and wants us to be happy”

Benjamin Franklin

RESUMO

A cerveja é uma das bebidas mais apreciadas e consumidas a nível mundial. Os variados estilos de cerveja existentes baseiam-se em conjugações de ingredientes, processamento e factores culturais. Porém, a diferenciação entre estilos de cerveja é maioritariamente originada por variações a nível do substrato (mosto) em detrimento de variações decorrentes da fermentação.

Apesar da levedura desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento sensorial da cerveja, a fermentação de cerveja é levada a cabo por uma variedade limitada de estirpes de leveduras, sendo estas, na sua maioria, pertencentes ao género *Saccharomyces*, quase exclusivamente *S. cerevisiae* ou *S. pastorianus*, com excepção de algumas cervejas de especialidade, nomeadamente *Lambic* e *Gueuze*.

O objectivo principal desta dissertação prende-se com a exploração da capacidade de leveduras não-convencionais, conjugadas com estirpes comerciais, como agentes de potenciação do perfil sensorial de cerveja. Assim, foram inoculados mostos de cerveja de estilos *Stout*, *Weiss* e *Dunkel* com estirpes de *Dekkera bruxellensis*, *Kloeckera apiculata*, *Torulaspora delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae* (não-comercial) e estirpes comerciais de *Saccharomyces* em fermentações sequenciais. Os ensaios fermentativos foram conduzidos sob condições controladas, monitorizando-se a sua evolução a nível microbiológico (contagem de células viáveis e cultiváveis) e a nível físico-químico (%brix, pH, açúcares e ácidos orgânicos por HPLC e compostos aromáticos por GC-FID). Foi ainda realizada uma análise sensorial para avaliar a aceitabilidade das cervejas produzidas.

As fermentações sequenciais foram bem sucedidas, atingindo níveis de etanol (2,84-6,89 %(v/v)) e açúcares residuais (4,0-15,2 g.L⁻¹) similares aos ensaios de controlo. Apesar das características analíticas das cervejas co-fermentadas não diferirem significativamente das cervejas de controlo, foi evidenciada uma clara distinção a nível do perfil aromático. Os estilos de cerveja *Stout* e *Dunkel* obtiveram melhor aceitação junto do painel de provadores, destacando-se, entre as leveduras não-convencionais utilizadas, *K. apiculata* e *T. delbrueckii* como as responsáveis pelas cervejas de perfil sensorial mais complexo.

Palavras-chave: cerveja, co-fermentação, leveduras não-convencionais, não-*Saccharomyces*, perfil aromático.

ABSTRACT

Beer is one of the most consumed beverages worldwide. The various styles of beer in existence evolved from the combination of ingredients, processing and cultural factors. However, the differentiation between styles of beer comprises mainly of variations in wort composition, rather than variations in the fermentation phase. Despite the fact that yeast plays a major role in the development of beer characteristic sensory traits, beer fermentation employs a very limited variety of yeasts, the majority of them belonging to the genus *Saccharomyces*, almost exclusively *S. cerevisiae* or *S. pastorianus*, with the exception of some specialty beers, namely *Lambic* and *Gueuze*.

The main objective of the present work was to evaluate the potential of non-conventional yeasts, combined with commercial strains, in the development of distinctive sensory profiles of several beer styles. Thus, wort of popular beer styles *Stout*, *Weiss* and *Dunkel* were produced and inoculated with wild strains of *Dekkera bruxellensis*, *Kloeckera apiculata*, *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae*, in sequential fermentation with commercial strains. The fermentation trials were conducted under controlled conditions, monitoring microbial growth and determination of sugars, ethanol, glycerol and organic acids by HPLC and aromatic compounds by GC-FID. Sensory analysis was also conducted to evaluate the beers' acceptability.

The sequential fermentations were successful, achieving levels of ethanol (2,84-6,89 %(v/v)) and residual sugar (4,0-15,2 g.L⁻¹) similar to control. Although the main analytical characters of the co-fermented beers were comparable with those of the control beer, a distinctive overall aromatic profile was perceived by the panel of tasters in the co-fermented beers. The beer styles *Stout* and *Dunkel* obtained the best classifications, in which *K. apiculata* and *T. delbrueckii* stand out as the yeast strains responsible for the highest rated co-fermented beers. Thus, non-*Saccharomyces* yeast can contribute to enhance the sensorial profile of beers without affecting essential analytic characteristics.

Keywords: beer, co-fermentation, non-conventional yeasts, non-*Saccharomyces*, aromatic profile.

ÍNDICE GERAL

Resumo	ii
Abstract.....	iii
Índice geral	iv
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	x
Lista de abreviaturas	xii
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento do trabalho	1
2. Revisão bibliográfica	2
2.1. A cerveja.....	2
2.1.1. Enquadramento histórico.....	2
2.1.2. Matérias-primas	4
2.1.2.1. Água	4
2.1.2.2. Cevada maltada.....	5
2.1.2.3. Lúpulo	6
2.1.2.4. Levedura.....	6
2.1.3. Estilos de cerveja.....	7
2.1.4. Consumo – cenário actual e tendências futuras	8
2.2. Processo de fabrico de cerveja	9
2.2.1. Brassagem.....	9
2.2.1.1. Moenda.....	10
2.2.1.2. Empastagem.....	10
2.2.1.3. Filtração do mosto (<i>Sparging</i>)	10
2.2.1.4. Ebulição do mosto	11
2.2.1.5. Arrefecimento e clarificação (<i>Whirlpool</i>).....	11
2.2.2. Fermentação.....	11
2.2.2.1. Fermentação alcoólica	11
2.2.2.2. Produtos metabólicos secundários.....	13
2.2.3. Maturação.....	15

2.3.	Importância da levedura no perfil sensorial da cerveja	16
2.4.	Microbiota da cerveja	17
2.4.1.	Gênero <i>Saccharomyces</i>	17
2.4.1.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.4.1.2.	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	18
2.4.2.	Gêneros não- <i>Saccharomyces</i>	19
2.4.2.1.	<i>Dekkera bruxellensis</i>	19
2.4.2.2.	<i>Kloeckera apiculata</i>	20
2.4.2.3.	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	21
2.4.2.3.	Outras leveduras não convencionais	22
3.	Materiais e métodos	23
3.1.	Estirpes e matérias-primas utilizadas	23
3.1.1.	Estirpes de leveduras e condições de crescimento	23
3.1.2.	Malte	23
3.1.3.	Lúpulo	24
3.2.	Ensaio fermentativo	24
3.2.1.	Produção do mosto	24
3.2.2.	Fermentação do mosto	25
3.2.3.	Engarrafamento e maturação	25
3.3.	Análise microbiológica	26
3.3.1.	Determinação do número de células viáveis e células totais	26
3.3.2.	Determinação do número de células viáveis e cultiváveis	26
3.4.	Análise química	27
3.4.1.	Determinação brix	27
3.4.2.	Determinação pH	27
3.4.3.	Determinação açúcares e ácidos orgânicos (HPLC)	27
3.4.4.	Análise compostos voláteis (GC-FID)	28
3.5.	Análise sensorial	29
3.6.	Análise estatística	29
4.	Resultados e discussão	30
4.1.	Preâmbulo	30

4.1.1. Selecção dos estilos de cerveja.....	30
4.1.2. Selecção das estirpes de levedura e condições de fermentação.....	30
4.1.3. Meio selectivo.....	32
4.1.4. Análise de compostos por HPLC	34
4.1.5. Análise do perfil aromático por Cromatografia Gasosa	37
4.2. Estilo <i>Stout</i>	39
4.2.1. Evolução dos ensaios fermentativos	39
4.2.1.1. Evolução da microbiota	39
4.2.1.2. Evolução físico-química.....	42
4.2.2. Produto final.....	44
4.2.2.1. Perfil físico-químico	44
4.2.2.2. Perfil aromático.....	46
4.2.2.3. Análise sensorial.....	47
4.3. Estilo <i>Weiss</i>	52
4.3.1. Evolução do ensaio fermentativo	52
4.3.1.1. Evolução da microbiota	52
4.3.1.2. Evolução físico-química.....	55
4.3.2. Produto final.....	57
4.3.2.1. Perfil físico-químico	57
4.3.2.2. Perfil aromático.....	58
4.3.2.3. Análise sensorial.....	59
4.4. Estilo <i>Dunkel</i>	61
4.4.1. Evolução dos ensaios fermentativos	61
4.4.1.1. Evolução da microbiota	61
4.4.1.2. Evolução físico-química.....	63
4.4.2. Produto final.....	66
4.4.2.1. Perfil físico-químico	66
4.4.2.2. Perfil aromático.....	67
4.4.2.3. Análise sensorial.....	68
4.5. Discussão geral	70
5. Considerações finais e perspectivas futuras	75

6. Bibliografia	77
7. Anexos	88
Anexo I: Receitas-base e programas de brassagem	88
Anexo II: Curvas de calibração HPLC	89
Anexo III: Curvas calibração e tempos de retenção GC	91
Anexo IV: Ficha de prova sensorial	93
Anexo V: Sequenciação levedura ISA1439	94
Anexo VI: Resultados tempos de retenção HPLC	96
Anexo VII: Resultados individuais da evolução da microbiota	102
Anexo VIII: Aromas identificados na análise sensorial	105
Anexo IX: Aparência das cervejas produzidas.	107
Anexo X: Resumo dos resultados dos ensaios fermentativos	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Esquema processo de fabrico de cerveja.....	9
Figura 2- Esquema fermentação alcoólica.....	12
Figura 3- Ligação entre vias metabólicas secundárias	13
Figura 4- Via metabólica de síntese de álcoois superiores.....	14
Figura 5- Via metabólica da produção de glicerol.....	15
Figura 6- Roda dos sabores da cerveja	16
Figura 7- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Figura 8- <i>Saccharomyces pastorianus</i>	18
Figura 9- <i>Dekkera bruxellensis</i>	19
Figura 10- <i>Kloeckera apiculata</i>	20
Figura 11- <i>Torulaspora delbrueckii</i>	21
Figura 12 – Equipamento utilizado na produção do mosto de cerveja	24
Figura 13- Ensaios fermentativos do mosto <i>Weiss</i>	25
Figura 14 - Vials de 2 mL de injeção GC.....	28
Figura 15 - Aparência microscópica das co-culturas	33
Figura 16 – Evolução do perfil físico-químico da cerveja durante a fermentação	35
Figura 17 – Cromatogramas ampliados na região de detecção de glicerol.....	35
Figura 18- Cromatograma solução aquosa ácido málico [10 mg.mL ⁻¹] + fructose [10 mg.mL ⁻¹].	36
Figura 19- Cromatograma ampliado na região de detecção de ácido cítrico	36
Figura 20- Curvas de crescimento das leveduras durante fermentações co-inoculadas e de controlo (mosto <i>Stout</i>).....	39
Figura 21- Evolução da viabilidade dos ensaios fermentativos em mosto <i>Stout</i>	41
Figura 22- Consumo de açúcares e produção de glicerol e etanol nos ensaios de mosto <i>Stout</i>	43
Figura 23- Resultados análise sensorial cervejas <i>Stout</i>	47
Figura 24- Curvas de crescimento das leveduras durante fermentações co-inoculadas e de controlo (mosto <i>Weiss</i>).....	52
Figura 25- Evolução da viabilidade nos ensaios fermentativos no mosto <i>Weiss</i>	54
Figura 26- Consumo de açúcares e produção de glicerol e etanol nos ensaios de mosto <i>Weiss</i>	56
Figura 27- Resultados análise sensorial cervejas <i>Weiss</i>	59
Figura 28- Curvas de crescimento das leveduras durante fermentações co-inoculadas e de controlo (mosto <i>Dunkel</i>)	61
Figura 29- Evolução da viabilidade nos ensaios fermentativos em mosto <i>Dunkel</i>	62
Figura 30- Consumo de açúcares e produção de glicerol e etanol nos ensaios de mosto <i>Dunkel</i>	64
Figura 31- Resultados análise sensorial cervejas <i>Dunkel</i>	68
Figura 32- Curvas de calibração de açúcares e glicerol	89
Figura 33- Curvas de calibração HPLC de ácidos orgânicos e etanol	90
Figura 34- Curvas de calibração GC composto fenólicos e carbonilados	91
Figura 35- Curvas de calibração GC de álcoois superiores.....	92

Figura 36- Análise BLAST com alinhamento da região ITS1-ITS4 da estirpe ISA 1439 com a região ITS1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EB6	94
Figura 37- Curvas de crescimento de ensaios individuais em mosto <i>Stout</i>	102
Figura 38- Curvas de crescimento de ensaios individuais em mosto <i>Weiss</i>	103
Figura 39- Curvas de crescimento de ensaios individuais em mosto <i>Dunkel</i>	104
Figura 40- Aparência final dos ensaios fermentativos do estilo <i>Stout</i>	107
Figura 41- Aparência final dos ensaios fermentativos do estilo <i>Weiss</i>	107
Figura 42- Aparência final dos ensaios fermentativos do estilo <i>Dunkel</i>	108

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Estilos de cerveja clássicos	8
Tabela 2- Principais enzimas envolvidas no processo de empastagem	10
Tabela 3- Principais produtos metabólicos secundários	13
Tabela 4- Estirpes de leveduras utilizadas nos ensaios	23
Tabela 5- Composição físico-química dos mostos <i>Stout</i> , <i>Weiss</i> e <i>Dunkel</i>	30
Tabela 6- Resistência de diversas estirpes de levedura ao antibiótico cicloheximida.....	34
Tabela 7- Viabilidade relativa inicial e final dos ensaios co-fermentativos	42
Tabela 8- Principais características analíticas das cervejas de controlo e co-fermentadas no mosto <i>Stout</i>	45
Tabela 9- Concentração de compostos voláteis presentes nas cervejas maturadas do estilo <i>Stout</i> (mg.L ⁻¹), determinação por GC-FID.....	46
Tabela 10- Avaliação final das cervejas do estilo <i>Stout</i>	49
Tabela 11- Viabilidade relativa inicial e final dos ensaios co-fermentativos (mosto <i>Weiss</i>)	55
Tabela 12- Principais características analíticas das cervejas de controlo e co-fermentadas no mosto <i>Weiss</i>	57
Tabela 13 - Concentração de compostos voláteis presentes nas cervejas do estilo <i>Weiss</i> (mg.L ⁻¹), determinação por GC-FID	58
Tabela 14- Avaliação final das cervejas do estilo <i>Weiss</i>	60
Tabela 15 - Viabilidade relativa inicial e final dos ensaios co-fermentados (mosto <i>Dunkel</i>)	63
Tabela 16- Principais características analíticas das cervejas de controlo e co-fermentadas no mosto <i>Dunkel</i>	66
Tabela 17- Concentração de compostos voláteis presentes nas cervejas do estilo <i>Dunkel</i> (mg.L ⁻¹), determinação por GC-FID	67
Tabela 18- Avaliação final das cervejas do estilo <i>Dunkel</i>	69
Tabela 19- Limite de detecção e concentração típica em cerveja de compostos voláteis e não-voláteis	73
Tabela 20- Concentração celular e viabilidade dos inóculos nos ensaios fermentativos	74
Tabela 21- Receita e programa de brassagem do mosto <i>Stout</i>	88
Tabela 22- Receita e programa de brassagem do mosto <i>Weiss</i>	88
Tabela 23- Receita e programa de brassagem do mosto <i>Dunkel</i>	88
Tabela 24- Tempos de retenção de compostos voláteis de interesse GC	92
Tabela 25- Tempos de retenção de compostos de interesse HPLC	96
Tabela 26- Relação entre tempos de retenção dos compostos de interesse e padrão interno nas amostras dos ensaios <i>Stout</i> 1ª réplica	96
Tabela 27- Relação entre tempos de retenção dos compostos de interesse e padrão interno nas amostras dos ensaios <i>Stout</i> 2ª réplica	97
Tabela 28- Relação entre tempos de retenção dos compostos de interesse e padrão interno nas amostras dos ensaios <i>Weiss</i> 1ª réplica.....	98

Tabela 29- Relação entre tempos de retenção dos compostos de interesse e padrão interno nas amostras dos ensaios <i>Weiss</i> 2ª réplica.....	99
Tabela 30- Relação entre tempos de retenção dos compostos de interesse e padrão interno nas amostras dos ensaios <i>Dunkel</i> 1ª réplica	100
Tabela 31- Relação entre tempos de retenção dos compostos de interesse e padrão interno nas amostras dos ensaios <i>Dunkel</i> 2ª réplica	101
Tabela 32- Avaliação da componente aromática das cervejas <i>Stout</i>	105
Tabela 33- Avaliação da componente aromática das cervejas <i>Weiss</i>	105
Tabela 34- Avaliação da componente aromática das cervejas <i>Dunkel</i>	106
Tabela 35- Resumo dos principais parâmetros analisados nos ensaios co-fermentados e ensaios de controlo	109

LISTA DE ABREVIATURAS

ABV – *Alcohol by volume*
ADP – adenosina di-fosfato
ATP – adenosina tri-fosfato
ANOVA – Análise variância
°Brix – grau brix
°C – grau Celsius
D.O._{640nm} – densidade óptica medida absorvância 640nm
EBC – *European Brewery Convention*
FID – *Flame Ionization Detector*
GC – *Gas Chromatography*
HPLC – *High Precision Liquid Chromatography*
LM – *Lysine medium*
MYGP – *Malt extract, yeast extract, glucose, peptone*
NAD – Dinucleótido de nicotinamida e adenina
PYCC – *Portuguese Yeast Culture Collection*
(m/v) – massa por volume
(m/m) – massa por massa
CC – curvas de calibração
Rpm – rotações por minuto
SPME – *Solid Phase Micro Extraction*
(v/v) – Volume por volume
UBA – *Universal Beer Agar*
UFC – Unidade formadora de colónia
 μ – taxa específica de crescimento
WLN – *Wallerstein Laboratory nutrient medium*
YPD – *Yeast extract Peptone Dextrose*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enquadramento do trabalho

A tendência actual do consumo de cerveja está em clara mutação, com a atenção do consumidor a deslocar-se para cervejas de especialidade, ganhando as microcervejarias cada vez mais terreno em relação às grandes empresas cervejeiras (Berkhout *et al.*, 2013). A exploração de novas conjugações de matérias-primas ou técnicas de produção de cerveja encontra-se claramente influenciada pela mudança do padrão de consumo de cerveja, levando à criação de inúmeros estilos de cerveja e diferentes variações dentro dos mesmos. A inovação na indústria cervejeira, além da introdução de novas combinações de maltes, lúpulos e outros aromáticos, passa igualmente pela inoculação de leveduras distintas no processo fermentativo. Na fase fermentativa, a potenciação de produção de compostos de aroma e *flavour* pela levedura poderá contribuir de forma mais definitiva para o desenvolvimento sensorial da cerveja (Michel *et al.* 2016; Basso *et al.*, 2016).

Desde a descoberta e isolamento das primeiras estirpes de *Saccharomyces* que a indústria cervejeira tem trabalhado no sentido de melhoramento e de homogeneidade das características fisiológicas das leveduras cervejeiras. Através do controlo e/ou previsão do metabolismo fermentativo das estirpes de levedura seleccionadas consegue-se obter um produto final de qualidade homogénea sem defeitos sensoriais significativos (Walker & Stewart, 2016). Assim, tradicionalmente a fermentação de cerveja é realizada com recurso a estirpes domesticadas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*. Apesar desta prática ser claramente benéfica no que diz respeito à consistência, eficiência e qualidade sensorial expectável, simultaneamente incorre na limitação do potencial das leveduras como agentes de produção de aromas e sabores (Steensels & Verstrepen, 2014).

A contribuição de leveduras não-*Saccharomyces* para o perfil sensorial de várias bebidas fermentadas tem sido revista, destacando literatura sobre o impacto do metabolismo de leveduras como *Kloeckera apiculata* (Zohre & Erten, 2002) e *Torulaspora delbrueckii* (Loira *et al.*, 2014; Loira *et al.*, 2015) nas propriedades sensoriais do vinho e o papel fundamental de estirpes de *Dekkera bruxellensis* no desenvolvimento sensorial de cervejas *Lambic* e *Gueuze* (Crauwels *et al.*, 2015) e da bebida fermentada de chá *kombucha* (Mayser *et al.*, 1995). As leveduras não-*Saccharomyces* são caracterizadas pelo menor rendimento em etanol e maior susceptibilidade a stress abióticos (Di Maro *et al.*, 2007), porém, o metabolismo pouco usual destas leveduras consegue afectar o perfil sensorial dos produtos finais, adicionado complexidade aromática (Vanderhaegen *et al.*, 2003). Algumas espécies de leveduras não-*Saccharomyces* são catalogadas como contaminantes de bebidas e alimentos, nomeadamente *Dekkera*, em que o impacto negativo no vinho é reconhecido (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). Todavia, várias leveduras não-*Saccharomyces* são actualmente utilizadas em condições de co-fermentação como forma de obtenção de produtos distintos e inovadores (Tataridis *et al.*, 2013; Ciani *et al.* 2010; Sarens & Swiegers, 2014).

O principal objectivo do presente trabalho prende-se com a exploração da capacidade de leveduras não-convencionais de potenciar o perfil sensorial de vários estilos de cerveja, avaliando, portanto, não só o contributo individual de cada estirpe para o produto final fermentado, mas também a versatilidade das mesmas em distintos estilos de cerveja. Pretendeu-se averiguar se a potenciação do perfil sensorial é independente do mosto ou se o impacto da co-inoculação é somente positivo em certos estilos de cerveja. Para tal, foram, numa primeira instância, produzidos mostos de estilos de cerveja populares do tipo *Ale* e *Lager*, sendo estes, de seguida, inoculados com estirpes de leveduras não-convencionais e estirpes comerciais de *Saccharomyces* em co-fermentação sequencial. Foram realizados ensaios fermentativos em duplicado, sendo que para cada estilo de cerveja, foi também conduzido um ensaio de controlo, somente inoculado com estirpes comerciais de *Saccharomyces*. Através da análise de diversos parâmetros microbiológicos (evolução células totais e viáveis) e físico-químicos (concentração de açúcares, etanol, glicerol, ácidos orgânicos e compostos aromáticos) pretendeu-se avaliar o impacto das leveduras não-convencionais no perfil sensorial do produto final, avaliando ainda a sua aceitabilidade e adequação ao estilo de cerveja através de análise sensorial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cerveja

O conceito de cerveja é relativamente ambíguo, podendo ser definida como uma bebida aquosa fermentada à base de amido e aromatizada com lúpulo (De Keukeleire, 2000). Segundo o disposto no artigo 1.º do Decreto-Lei n.º 93/94, de 7 de Abril, esta deve ser uma bebida “obtida por fermentação alcoólica, mediante leveduras seleccionadas do género *Saccharomyces*” e o mosto deve ter origem “a partir de malte de cereais, principalmente cevada, e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas” (“Portaria nº1/96” 1996). No entanto, a cerveja, como produto, dada a extensão de estilos que comporta, revela uma abrangência de matérias-primas e processos que dificilmente se enquadram nos parâmetros destas definições (Meussdoerffer, 2009). Actualmente, a cerveja é um termo genérico utilizado para designar uma plethora de bebidas com características organolépticas completamente distintas. Apesar da sobreposição inevitável de algumas matérias-primas e processos, várias bebidas com a designação de cerveja distanciam-se significativamente do conceito original (Boulton & Quain, 2008). Assim, uma definição mais geral poderá ser mais correcta, considerando a cerveja simplesmente como uma bebida produzida por fermentação de um meio aquoso que contém açúcares derivados maioritariamente de cereais (Boulton & Quain, 2008).

2.1.1. Enquadramento histórico

A maior parte dos historiadores concordam que a história da cerveja e da fermentação em geral terá origem nas antigas civilizações urbanas da Mesopotâmia, por volta de 6000 a.C. (Hornsey, 2003). Porém, existem provas que apontam que bebidas fermentadas que se assemelhavam a cerveja já

seriam produzidas por civilizações na Ásia menor pelo menos um milhar de anos antes (McGovern *et al.*, 2004). A origem da cerveja poderá ser ainda mais antiga, remontando a 9000 a.C. durante a revolução Neolítica, com o surgimento das primeiras populações sedentárias (Hornsey, 2003) .

A história da cerveja encontra-se intimamente ligada com a história da humanidade em si (Meussdoerffer, 2009). A partir do momento em que populações nómadas começaram a formar pequenos grupos sedentários, surgindo, por consequência, a necessidade de domesticação e armazenamento de culturas hortofrutícolas, a descoberta da fermentação era inevitável. O armazenamento de cereais poderá ter despoletado a descoberta da fermentação e o Homem, observando as vantagens enormes do processo aparentemente espontâneo, terá desenvolvido técnicas que garantissem a reprodutibilidade desse fenómeno (Willaert, 2012).

Desde a descoberta da fermentação, que as bebidas fermentadas ocupam um lugar cimeiro em termos de importância cultural, social e económica (Meussdoerffer, 2009). A civilização babilónica desenvolveu a arte de fermentação de cereais, essencialmente cevada e trigo Farro (*Triticum turgidum var. Dicoccum*) ao ponto de terem formulado cerca de 20 tipos distintos de cerveja, incluindo regulamentação estrita sobre técnicas e matérias-primas no Código de Hammurabi (manuscrito que compilava regras e leis da civilização Babilónica durante o reinado do rei Hammurabi) (Eblinger & Narzib, 2012). A civilização egípcia é exemplo de outra grande civilização ancestral na qual a cerveja desempenhava um papel crucial. Mais do que a bebida preferida e alimento essencial na dieta egípcia, a cerveja desempenhava um papel dominante no culto religioso e na medicina (Anderson, 2006).

A cultura e tecnologia de fermentação de cereais expandiu-se da Mesopotâmia para a Europa mediterrânica durante o século 300 a.C., apesar de, na Europa do norte, a cerveja já ser produzida há vários milénios (Meussdoerffer, 2009). A cerveja na civilização helénica e mais tarde na civilização romana, era pouco consumida em comparação com o vinho, quer por razões culturais como por razões ideológicas. A cerveja era vista como a bebida dos bárbaros que ocupavam as regiões norte e este da Europa, sendo apenas consumida por estratos socialmente inferiores (Nelson *et al.*, 2003).

Após a queda do império romano, a cerveja retomou o lugar de bebida soberana na Europa, devido à ocupação de tribos germânicas, nas quais a cerveja era a bebida de eleição (Willaert, 2012). Durante esse período e até ao século XII, a produção de cerveja era apenas realizada em mosteiros, onde a cerveja não era só produzida para consumo próprio dos monges mas também como moeda de troca (Hornsey, 2003). Durante este período, mais precisamente a partir do século IX, o lúpulo começa a ser adicionado à cerveja, prática iniciada em vários mosteiros e abadias que perdura até os dias de hoje (Meussdoerffer, 2009).

As bases da indústria cervejeira não se desenvolveriam, no entanto, até o surgimento de grandes centros urbanos, nos quais, a densidade populacional crescente amiúde vezes levaria à contaminação de fontes de água, estimulando a procura de alternativas viáveis, encontrando na cerveja a resposta lógica (Hornsey, 2003; Willaert, 2012). A procura crescente catapultou o processo de especialização e a dimensão da indústria cervejeira na Europa, atingindo o ponto que houve necessidade de intervenção do Estado.

A lei da pureza da cerveja, também conhecida como *Reinheitsgebot* é baseada na legislação introduzida na Baviera, em 1516, pelo Duque Guilherme IV. Esta lei estipulava que a bebida conhecida como cerveja apenas poderia ser fabricada a partir de cevada maltada, lúpulos e água, excluindo, por desconhecimento da sua existência, a levedura (Boulton & Quain, 2008). Esta lei visava não só regulamentar a produção de cerveja e o seu consumo, mas também salvaguardar os interesses dos padeiros, em detrimento dos cervejeiros, pela concorrência directa pelos cereais que eram usados no fabrico de pão (Anderson, 2006; Meussdoerffer, 2009).

A revolução industrial do início do século XIX veio cimentar a especialização e a tecnologia associada à produção de cerveja, introduzindo técnicas e equipamentos mais eficientes. Surge também nesta altura, a primeira cerveja do estilo *Lager, Pilsner*, pela mão do mestre cervejeiro *Josef Groll*, em 1842, na cidade de *Plzen* (Meussdoerffer, 2009). Em meados do século XIX, o avanço tecnológico e científico proporcionou a fundação de uma nova ciência: a microbiologia, contribuindo de forma drástica para a compreensão do processo de fermentação alcoólica - cujo fundamento foi demonstrado por *Louis Pasteur* entre 1855 e 1875, esclarecendo indubitavelmente o papel da levedura neste processo (Bamforth, 2003). Pouco anos mais tarde *Emil Christian Hansen* viria a isolar pela primeira vez estirpes de leveduras. Estavam então delineados os alicerces daquilo que se afirmaria mais tarde como uma das indústrias alimentares de maior dimensão no Mundo, assumindo, paralelamente, a fermentação em geral e a produção de cerveja em particular, como uma importante área científica (Boulton & Quain, 2008).

2.1.2. Matérias-primas

Em termos genéricos, a cerveja é produzida a partir de quatro ingredientes essenciais: água, cevada maltada, lúpulos e levedura. Os ingredientes mencionados são transversais, em maior ou menor grau, a todos os tipos de cerveja. Porém, variações e combinações dessas matérias-primas é prática comum na indústria cervejeira, sendo, aliás, um factor determinante na diferenciação e definição de estilos de cerveja (Papazian, 2006).

2.1.2.1. Água

Água é indubitavelmente o principal ingrediente da cerveja. Este elemento é de tal forma importante que as diferentes composições de água estão na origem do surgimento de diferentes tipos de cervejas consoante a região de produção (Eblinger & Narzib, 2012).

A cerveja, como produto final fermentado e maturado, é composta por 90% de água, sendo portanto essencial precisar a composição da água utilizada não só na brassagem mas também nas restantes etapas do processamento (Taylor, 2006). O conteúdo de sais dissolvidos e pH são os parâmetros mais importantes a avaliar na água devido à influência directa em várias propriedades da cerveja, incluindo o *flavour* final (Moll, 1979).

A água a ser usada directamente no processamento deve ser potável, livre de microorganismos patogénicos e impurezas. Porém, o tratamento da água excede a simples inocuidade microbiológica, química e física, sendo frequentemente necessário ajustar a concentração e composição de iões minerais consoante o estilo de cerveja a produzir (Willaert, 2012). Os iões presentes na água desempenham funções importantes em várias fases de produção de cerveja. A título de exemplo: **cálcio** estabiliza actividade enzimática durante a brassagem, auxiliando ainda no metabolismo e floculação da levedura e na coagulação de proteínas; **magnésio** permite o abaixamento do pH do mosto além de ser um micronutriente essencial para o desenvolvimento da levedura; e **sulfato** potencia o aroma e sabor do lúpulo. Assim, um bom equilíbrio na composição da água melhora a performance durante a brassagem, assegura uma boa fermentação e auxilia na clarificação da cerveja (Palmer & Kaminski, 2013).

2.1.2.2. Cevada maltada

Apesar de a cerveja permitir a utilização de diversos tipos de cereais (maltados ou não), a cevada (*Hordeum vulgare*, *vulgare* L.) é insubstituível na sua produção, sendo o cereal ideal por razões do foro sensorial, tecnológico e até histórico (Oliver, 2011). Comparando com outros cereais, a cevada possui, entre outras, as seguintes vantagens: maior facilidade no controlo da germinação durante a maltagem; maior poder diastático comparativamente com outros cereais; nível sensorial superior da cerveja feita a partir de cevada; e casca da cevada actua como agente natural filtrante do mosto (Eblinger & Narzib, 2012).

Previamente à utilização da cevada no fabrico de cerveja, esta deve passar por um processo de maltagem. Este pode ser definido como a germinação controlada de cereais com o propósito de alteração física e bioquímica do grão, sendo esta alteração estabilizada através da secagem do grão (Gupta *et al.*, 2010). Este processo é conduzido com o intuito de síntese de enzimas proteolíticas e amilolíticas, modificação da estrutura do grão (tornando-o mais friável e assim mais apto para moenda) e formação de compostos de *flavour* e de aroma (Bamforth, 2003; Willaert, 2012).

O malte influencia definitivamente a cor, aroma e *flavour* da cerveja, sendo que essas propriedades são desenvolvidas no malte durante a fase de secagem do grão na última etapa do processo de maltagem. Entre as reacções que conduzem à formação destes compostos destacam-se: reacções de *Maillard*, caramelização de açúcares e degradação de proteínas, lípidos e compostos fenólicos (Ullrich, 2011).

A aplicação de distintos binómios tempo/temperatura na fase de secagem, dão origem aos diferentes tipos de maltes disponíveis no mercado. Em função desse binómio, o malte pode ser dividido em 2 grandes grupos: maltes de base e maltes de especialidade (Oliver, 2011). Os maltes base devido à aplicação de um binómio mais suave (temperatura baixa, tempo prolongado) permitem a conservação quase total da fracção enzimática, limitando, no entanto, a formação de compostos de *flavour* e aroma. Contrariamente, os maltes de especialidade, em maior ou menor grau, são sujeitos a temperaturas mais elevadas durante a secagem, inactivando parcial ou totalmente as enzimas, favorecendo, no entanto, o aroma e o *flavour* do malte (Willaert, 2012). Assim os maltes base são aplicados em maiores

quantidades durante a produção de cerveja com o intuito primário de garantir a conversão eficaz do amido em açúcares fermentescíveis, enquanto a adição de maltes de especialidade é realizada no sentido de adicionar complexidade sensorial à cerveja (Bamforth, 2003). A selecção dos tipos de malte e as respectivas quantidades encontram-se sempre sujeitas à exigência do estilo de cerveja a fabricar.

2.1.2.3. Lúpulo

Lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma trepadeira perene de origem europeia, cujas flores fêmeas apresentam grande quantidade de resinas amargas e óleos essenciais, que conferem à cerveja o seu característico sabor amargo. É considerado o principal aditivo de aroma e paladar da cerveja, contribuindo também para a sua estabilidade microbológica e físico-química (Nance & Setzer, 2011). Além da formação de complexos insolúveis com proteínas e polipéptidos, contribuindo para a estabilidade coloidal da cerveja, a sua clarificação e a estabilidade da espuma, o lúpulo, devido à sua actividade anti-bacteriana, age como agente de esterilização do mosto (De Keukeleire, 2000).

A fracção resinosa do lúpulo contém ácidos alfa, responsáveis pelo carácter amargo do lúpulo, enquanto os seus óleos essenciais representam a sua componente aromática (Eblinger & Narzib, 2012). As variações das percentagens destas duas fracções entre as espécies de lúpulo acabam por ser o principal factor de distinção entre lúpulos de amargor e lúpulos de aroma. Os primeiros, devido à sua elevada concentração de ácidos alfa, são utilizados essencialmente pelo amargor, enquanto os lúpulos de aroma são caracterizados pela superior fracção de óleos essenciais em detrimento de ácidos alfa, sendo valorizados pela elevada capacidade de aromatização da cerveja (Hieronymus, 2012; Lewis & Young, 2002).

2.1.2.4. Levedura

A levedura é responsável pela transformação dos açúcares fermentescíveis presentes no mosto em etanol e dióxido de carbono, além de uma extensa panóplia de outros compostos que irão influenciar o paladar e aroma da cerveja (Russell, 2006). Os benefícios da actividade da levedura estendem-se para além do perfil sensorial, pois, devido à produção de etanol e de diversos metabolitos que provocam um decréscimo do valor de pH da cerveja, esta acaba por ser um produto microbiologicamente mais estável (Boulton & Quain, 2008).

A natureza de qualquer bebida alcoólica é determinada não só pela estirpe de levedura utilizada no processo fermentativo mas também pelo substrato que esta converte (Bamforth, 2003). Assim, a influência da levedura é determinante na qualidade final da cerveja, sendo imperativo além da selecção do género, espécie e estirpe adequada ao estilo de cerveja, garantir a sua viabilidade e inoculação sem contaminação e propiciar um perfil físico-químico do mosto e condições de fermentação ideais para o seu crescimento (Quain, 1986).

Historicamente, a fermentação do mosto da cerveja é levado a cabo por leveduras do género *Saccharomyces*, pertencentes à família *Saccharomycetaceae* (Eblinger & Narzib, 2012). A espécie e estirpe de levedura utilizada varia consoante o estilo de cerveja, mas, de forma clássica, para estilos de cerveja de baixa fermentação (cervejas fermentadas a baixa temperatura, estilos *Lager*) são

utilizadas leveduras da espécie *Saccharomyces pastorianus*, enquanto aquelas de alta fermentação (cervejas fermentadas a temperatura superior, estilos *Ale*) recorrem a estirpes da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, adoptando as leveduras essa mesma designação, leveduras de baixa e alta fermentação (Eblinger & Narzib, 2012). Esta distinção decorre de diversas características fisiológicas específicas para cada uma delas, tais como: a capacidade de floculação, temperatura óptima de crescimento ou até a capacidade de utilização de certos dissacáridos (Vidgren, 2010). Por exemplo, leveduras de baixa fermentação, têm capacidade de fermentar melibiose, fermentam mais eficientemente maltotriose, possuem maior capacidade de floculação e fermentam a temperaturas mais baixas (7-15°C). Já aquelas denominadas de alta fermentação não conseguem fermentar o dissacárido mencionado além do seu crescimento ser optimizado a temperaturas mais elevadas (18-22°C) (Russell, 2006).

2.1.3. Estilos de cerveja

Os estilos de cerveja encontram-se em constante mudança, estando a definição dos mesmos aberta a interpretação e debate. Diversos factores participam na mutação perpétua da tipologia das cervejas tais como mudanças tecnológicas, evolução de técnicas, alterações nas matérias-primas ou até a própria percepção do consumidor (Strong & England, 2015).

A distinção mais comum da cerveja baseia-se no tipo de levedura utilizada durante a fermentação (Bamforth, 2003). As cervejas fermentadas com leveduras de fermentação alta são designadas de *Ales*, enquanto *Lager* é a denominação comum para todas aquelas fermentadas com leveduras de baixa fermentação. Pode-se ainda incluir uma terceira categoria genérica que alberga todos os estilos de cerveja que são fermentados de forma espontânea ou são inoculados com bactérias ou leveduras de géneros não-*Saccharomyces* (selvagem ou de fermentação espontânea) (Strong & England, 2015). A partir destas categorias gerais, factores como o local geográfico de origem e a combinação de matérias-primas utilizadas (maltes e lúpulos) conduzem à ramificação dos estilos de cerveja (Papazian, 2006).

A definição dos estilos de cerveja é então baseada na natureza das matérias-primas, o tipo de levedura utilizado, o país ou região de origem e o processo adoptado para a sua produção (Boulton & Quain, 2008). De igual forma, a definição do estilo não pode ser dissociada do factor histórico, sendo que técnicas e matérias-primas envolvidas na génese de vários estilos permaneceram inalteradas até hoje (Boulton & Quain, 2008). Apesar de ser evidente e incontornável a sobreposição de alguns destes factores em estilos distintos, as variadas combinações existentes resultam em cervejas com características específicas e diferenciadoras.

A Tabela 1 resume os estilos mais populares, não tentando, no entanto, albergar todos os estilos de cerveja existentes.

Tabela 1- Estilos de cerveja clássicos. Adaptado de (Boulton & Quain, 2008; Strong & England, 2015)

Estilo cerveja	Origem	Tipo de fermentação	ABV	Descrição
Pilsner	Boémia (República checa)	Baixa	5%	<i>Lager</i> pálida muito lupulada, produzida com água suave.
Dortmunder	Vestfália (Alemanha)	Baixa	5,2%	<i>Lager</i> de cor dourada, menos lupulada que a <i>Pilsner</i> .
Dunkel	Munique, Baviera (Alemanha)	Baixa	4,5-5,6%	<i>Lager</i> escura, maltada e levemente lupulada.
Bock	Einbeck (Alemanha)	Baixa	5,5-7,5%	Cerveja castanho escuro forte, levemente lupulada.
Helles	Munique, Baviera (Alemanha)	Baixa	4-6%	Versão mais pálida da <i>Dunkel</i>
Bitter Ale	Reino Unido	Alta	3,5-5,5%	<i>Ale</i> amarga de cor pálida acastanhada.
Brown Ale	Reino Unido	Alta	3,5-4,5%	<i>Ale</i> adocicada, corpo inteiro e ligeiramente lupulada.
India Pale Ale	Reino Unido	Alta	5,5-7,5%	<i>Ale</i> fortemente amarga.
Kölsch	Colónia (Alemanha)	Alta	4,6%	<i>Ale</i> dourada muito lupulada com paladar ácido/láctico
Weiss	Baviera (Alemanha)	Alta	4,0-5,6%	Cerveja de trigo ligeiramente lupulada, gosto fenólico.
Lambic	Bruxelas (Bélgica)	Espontânea	5-6,5%	Cerveja azeda.
Gueze	Bruxelas (Bélgica)	Refermentação em garrafa	5-5,5%	Mistura de <i>Lambics</i> novas e envelhecidas. Cerveja seca e frutada.
Porter	Londres (Reino Unido)	Alta	6-7%	<i>Ale</i> de cor rubi intensa, feita com água londrina, alta em bicarbonato.
Smoked	Bavaria (Alemanha)	Baixa	4,5-7%	Cerveja escura com paladar fumado.
Saison	Valónia (Bélgica)	Alta	5,5-6%	<i>Ale</i> de cor âmbar, muito aromática.
Scotch Ale	Escócia (Reino Unido)	Baixa	7-10%	<i>Ale</i> castanha escura, fortemente doce, paladar cremoso.
Stout	Reino Unido	Alta	4-5%	Cerveja muito escura e muito lupulada.
Trappist	Abadias belgas e holandesas	Alta	5-12%	Cervejas de cor âmbar e castanha, diferentes intensidades aromáticas.

2.1.4. Consumo – cenário actual e tendências futuras

Cerveja é a bebida alcoólica mais consumida a nível global (Colen & Swinnen, 2016). Entre o ano de 1970 e 2004 o consumo de cerveja, a nível mundial, mais do que duplicou passando de 600 milhões hL para mais de 1,2 milhares de milhões hL (FAO, 2009). Apesar do crescimento constante da cerveja a nível mundial, tem-se verificado na última década uma mudança no seu consumo quer a nível geográfico quer a nível da preferência dos consumidores (Swinnen, 2011).

O consumo de cerveja nos mercados tradicionais maduros como a Europa de Leste, os E.U.A e a Austrália tem verificado uma estagnação e até diminuição. Paralelamente, têm surgido mercados emergentes como a Rússia, Brasil ou China, nos quais a procura e consumo de cerveja é fortemente crescente (Colen & Swinnen, 2016).

Em termos da tipologia de cerveja consumida, é inegável a importância crescente do segmento de cervejas artesanais e cervejas de especialidade, que rapidamente tem conquistado o mercado a nível mundial, tanto nos mercados maduros como emergentes (German Estevez *et al.*, 2015). A introdução da cerveja artesanal possibilitou o alargamento do horizonte organoléptico da cerveja ao consumidor comum, até então saturado pela supremacia da cerveja suave do tipo *Lager* (Elzinga *et al.*, 2015). Assim, a tendência actual e futura remete a procura na direcção de cervejas artesanais e cervejas de especialidade em detrimento das cervejas comerciais clássicas (Berkhout *et al.*, 2013), antecipando-se um crescimento médio anual deste segmento de cerca de 9,3% no período de 2015-2020 (Bisht, 2015).

2.2. Processo de fabrico de cerveja

Devido à complexidade deste processo a nível químico, a diferentes pontos de vista e interpretações do processo, a diferenças pontuais que surgem com o equipamento utilizado e devendo garantir que o foco do presente trabalho permanece inalterado, este subcapítulo apresentará uma versão muito resumida do processo. Assim, a Figura 1 apresenta um esquema elucidativo do processo de fabrico de cerveja.

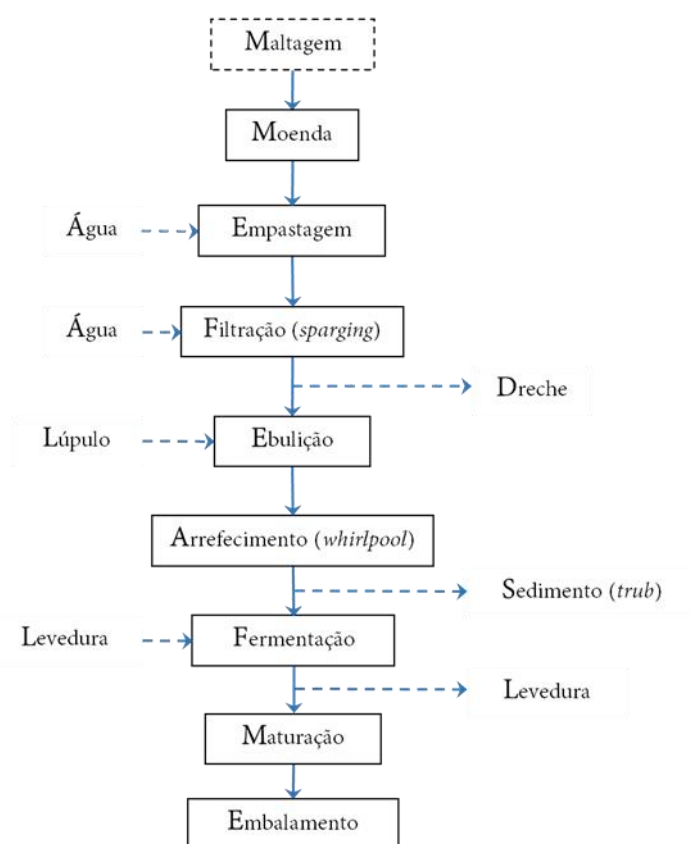


Figura 1- Esquema processo de fabrico de cerveja. Elaboração própria.

2.2.1. Brassagem

Entende-se por brassagem todas as etapas do processo de fabrico da cerveja que sucedem a maltagem do cereal e antecedem a fase fermentativa. Essencialmente a brassagem pode ser definida como todas as operações unitárias e conjunto de reacções químicas que resultam no mosto lupulado pronto a ser inoculado. Segundo a Figura 1, a brassagem inclui as etapas moenda, empastagem, filtração, ebulição e arrefecimento.

2.2.1.1. Moenda

A moenda é realizada com o principal intuito de expor o endosperma do grão ao exterior de modo a facilitar a solubilização e posterior hidrólise do amido (Eaton, 2006). É fundamental que esta operação unitária seja bem conduzida, pois uma moenda imprópria pode comprometer fases posteriores do processo de brassagem, afectando o seu rendimento e derradeiramente a qualidade do produto final (Warpala & Pandiella, 2000). A moenda correcta dos maltes permite simultaneamente a conversão eficiente do amido em açúcares fermentescíveis e uma adequada filtração após a fase da empastagem, uma vez que a casca intacta ou minimamente danificada actua como agente filtrante natural (Mousia *et al.*, 2004). Caso a moenda seja demasiado fina haverá muitas partículas em suspensão aumentando a probabilidade de turvação da cerveja.

2.2.1.2. Empastagem

Durante a fase de empastagem ocorre a extracção e conversão da fracção amilácea do cereal em açúcares fermentescíveis (glucose, maltose e maltotriose) e dextrinas (Whitehurst & Oort, 2010; Imure & Sato, 2013). Para tal, são estabelecidos vários binómios de tempo/temperatura, tendo em conta as diferentes enzimas em acção e respectivas temperaturas óptimas de activação, de modo a produzir um mosto com as características desejadas. As enzimas de maior interesse na formação do mosto encontram-se listadas na Tabela 2, sendo o programa de empastagem condicionado pela actividade das mesmas (Denault *et al.*, 1981). Assim, independentemente do estilo de cerveja, é comum incluir quatro patamares de temperaturas: 45-50°C (degradação das β -glucanas e actividade de enzimas proteolíticas); 60-65°C (formação de maltose por acção da β -amilase); 70-75°C (actividade da α -amilase, formação de glucose, maltotriose e outros açúcares); 78°C (inactivação das enzimas, diminuição da viscosidade do mosto) variando o tempo de permanência de cada um de forma a obter diferentes perfis de cerveja (Vivian *et al.*, 2016).

Tabela 2- Principais enzimas envolvidas no processo de empastagem. Adaptado de: (Lafond *et al.*, 2012; Denault *et al.*, 1981; Eblinger & Narzib, 2012; Vengadaramana, 2013)

Enzima	T°C óptima	T°C inactivação	Produto final
α -amilase	70-75	80	Glucose, dextrinas, oligossacáridos.
β -amilase	60-65	70	Maltose
β -glucanases	40-45	55	Glucose, Gluco-oligossacáridos
Proteinases	45-50	55	Péptidos de baixo peso molecular, aminoácidos.

2.2.1.3. Filtração do mosto (*Sparging*)

Finalizada a fase de brassagem, o mosto açucarado é separado dos grãos de malte demolidos (dreche), composto essencialmente por materiais insolúveis. De forma a garantir a extracção eficaz de todos os açúcares residuais ainda presentes no grão, este é lavado com água a mesma temperatura em que foi finalizada a fase de empastagem (e.g. 78°C) (Whitehurst & Oort, 2010). Esta técnica, denominada de *sparging*, é aplicada com o principal objectivo de aumentar o rendimento do processo

de empastagem em termos de concentração de açúcares extraídos do malte (Eaton, 2006). Somente após o escoamento completo da água do *sparging* é que se procede à fase seguinte de ebulição do mosto.

2.2.1.4. Ebulição do mosto

O mosto é levado a 100°C, permanecendo num estado de ebulição durante 60-90 minutos (Willaert *et al.*, 2015). Durante esse período, são adicionados, com tempos de residência específicos, lúpulos de amargor e de aroma. Os lúpulos de amargor são adicionados mais precocemente de modo a possibilitar a isomerização dos ácidos alfa (humulonas), que nesta forma possuem um maior amargor, além de maior solubilidade (De Keukeleire, 2000). Por outro lado, os lúpulos de aroma, mais ricos em óleos essenciais, compostos altamente voláteis, são adicionados mais tardiamente na fase de ebulição (De Keukeleire, 2000; Hieronymus, 2012). Para além da função principal de esterilização do mosto e extracção de compostos dos lúpulos, a fase de ebulição também desempenha funções no sentido de coagulação de proteínas e taninos, formação de compostos de cor e *flavour* e remoção de compostos voláteis indesejáveis (e.g. Dimetilsulfureto) (Iimure & Sato, 2013; Vivian *et al.*, 2016; Eaton, 2006).

2.2.1.5. Arrefecimento e clarificação (*Whirlpool*)

Finalizada a etapa de ebulição do mosto, este deve ser arrefecido até uma temperatura que possibilite a inoculação da levedura. De modo a garantir um arrefecimento rápido do mosto, é comum utilizar um permutador de placas (Bamforth, 2003). Paralelamente, o sedimento produzido durante a fase de ebulição deve ser devidamente separado do mosto final, recorrendo-se a uma simples técnica de separação para o efeito: *Whirlpool*. Através da aplicação de forças centrífugas e centrípetas, o sedimento formado permanece depositado no centro do equipamento, transferindo-se o mosto a partir da zona periférica (Eaton, 2006). Durante a transferência do mosto clarificado e arrefecido deve-se promover a sua oxigenação, critério importante para o desenvolvimento inicial da levedura (Boulton & Quain, 2008).

2.2.2. Fermentação

O processo de fermentação é iniciado pela inoculação do mosto, designado de *pitching* em gíria cervejeira. A concentração típica de inóculo varia entre 5×10^6 e 2×10^7 de células de levedura por mL de mosto (Eblinger & Narzib, 2012; Eaton, 2006). Nesta etapa do processamento, a levedura inoculada irá utilizar os nutrientes presentes no mosto para o seu crescimento, convertendo concomitantemente o mosto em cerveja. A cerveja não deixa de ser um subproduto da actividade metabólica da levedura. Portanto, é necessário que as condições de fermentação sejam tais que possibilitem o seu crescimento controlado, resultando na formação atempada dos produtos metabólicos de interesse na quantidade desejada (Boulton & Quain, 2008).

2.2.2.1. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é via metabólica preferencial das leveduras cervejeiras para obtenção de energia (Walker & Stewart, 2016; White & Zainasheff, 2010). A levedura produz como principais

produtos decorrentes do catabolismo de açúcares, etanol e dióxido de carbono (Rodman e Gerogiorgis, 2016), como se pode observar na Figura 2, que sintetiza os principais produtos finais e intermediários desta via metabólica.

Na ausência de oxigênio molecular ou na presença de elevadas concentrações de açúcares fermentescíveis, nomeadamente glucose, a levedura irá optar pela via fermentativa, obtendo energia por fosforilação a nível do substrato (Kitagaki & Takagi, 2014). Esta ocorrência, designada de efeito de *crabtree*, dita que na presença de glucose acima de $[150 \text{ mg.L}^{-1}]$, este monossacárido exerce repressão ou pelo menos catalisa a repressão de genes estruturais responsáveis pela síntese de enzimas respiratórias, inibindo assim a via metabólica respiratória (Barnett & Entian, 2005; Gancedo, 1998; Pfeiffer *et al.*, 2014). Este efeito é talvez a característica fisiológica mais importante da levedura, garantindo que a via fermentativa se encontra activa durante todo processo, mesmo na presença de oxigênio. Além do elevado fluxo de fonte de carbono e a produção mais célere de energia através da via fermentativa comparada com a respiração, o efeito de *crabtree* coaduna-se com uma estratégia de “produzir-acumular-consumir” em que o etanol é produzido provavelmente de modo a inibir o crescimento de outros microorganismos sendo mais tarde consumido após o esgotamento de açúcares. Contudo o consumo de etanol apenas ocorre na presença de oxigênio, o que não sucede durante o processo de produção de cerveja (Steensels & Verstrepen, 2014).

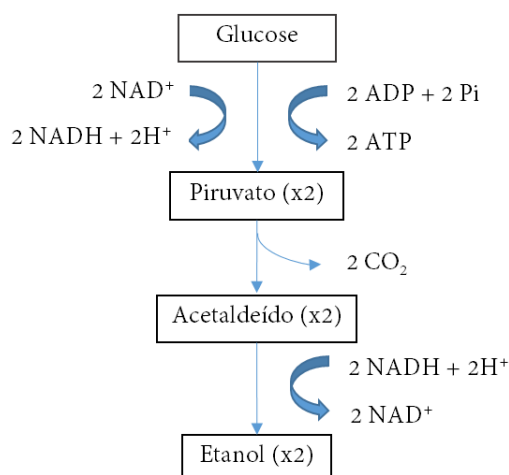


Figura 2- Esquema fermentação alcoólica. Adaptado de (Walker & Stewart, 2016)

Nesta via metabólica a formação de ATP deriva exclusivamente da glicólise por fosforilação a nível do substrato (Briggs *et al.*, 2004). A produção de etanol tem como principal propósito a regeneração do potencial redutor NAD^+ , de modo a manter o equilíbrio redox, evitando a acumulação de NADH^- e a inevitável interrupção da fermentação (Briggs *et al.*, 2004).

Apesar de os principais produtos decorrentes do catabolismo de açúcares serem etanol e dióxido de carbono, a conversão de açúcares em etanol é apenas 85% da quantidade teórica pois parte dos açúcares são metabolizados para a produção de biomassa e metabolitos secundários, como por exemplo ácidos orgânicos e polióis (Briggs *et al.*, 2004).

2.2.2.2. Produtos metabólicos secundários

O metabolismo secundário é constituído por um grupo de reacções que apesar de serem dispensáveis ao crescimento celular, originam produtos que desempenham papéis funcionais importantes (Leitão *et al.*, 2017). Variados produtos metabólicos secundários são formados como mecanismos de defesa em resposta a stresses bióticos ou abióticos, podendo também actuar como moléculas reguladoras (Siddiqui *et al.*, 2012).

Os produtos metabólicos secundários das leveduras cervejeiras, nomeadamente *Saccharomyces cerevisiae*, apesar de serem produzidos em concentrações significativamente menores em relação aos produtos principais, assumem grande importância para a complexidade sensorial da cerveja (Walker & Stewart, 2016). Na Tabela 3 encontram-se listados as classes de metabolitos e exemplos mais comuns, encontrando-se na Figura 3 um esquema elucidativo da interdependência das vias metabólicas secundárias.

Tabela 3- Principais produtos metabólicos secundários. Fonte: (Walker & Stewart, 2016)

Classe de metabolitos	Exemplos
Ácidos orgânicos	Ácido acético, succínico
Alcoois superiores	Alcool isoamílico, propanol
Compostos carbonilados	Acetaldeído, Diacetilo
Compostos de enxofre	Dimetil sulfureto
Compostos fenólicos	4-Vinilguaiaicol, 4-Etilfenol
Ésteres	Acetato de etilo
Polióis	Glicerol

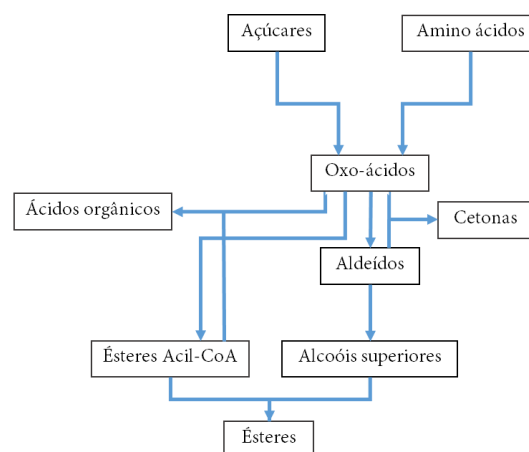


Figura 3– Ligação entre vias metabólicas secundárias. Adaptado de: (Briggs *et al.*, 2004)

Ácidos orgânicos

Apesar da presença de alguns ácidos orgânicos no mosto, derivados do malte, a levedura é responsável pela síntese e excreção de uma fracção significativa da concentração final de ácidos orgânicos presentes na cerveja (Coote & Kirsop, 1974). Parte da estabilidade microbiológica da cerveja deve-se à presença destes ácidos orgânicos que provocam a descida do valor de pH, para além de adicionarem *flavour* característico à cerveja (Briggs *et al.*, 2004). Em relação à sua formação, existem diversas vias metabólicas possíveis, sendo que, no entanto, a maioria deriva directamente do piruvato ou resulta do ciclo de *Krebs* incompleto ou ramificado, característico da repressão da respiração nas leveduras *Crabtree* positivas (Wales & Cartledge, 1980; Briggs *et al.*, 2004). Os ácidos orgânicos podem ainda surgir através do catabolismo de aminoácidos. A concentração extracelular de alguns ácidos orgânicos pode aumentar ou diminuir durante a fermentação, uma vez que ácidos excretados podem ser posteriormente assimilados e convertidos pela levedura (Boulton & Quain, 2008; Coote & Kirsop, 1974).

Álcoois superiores

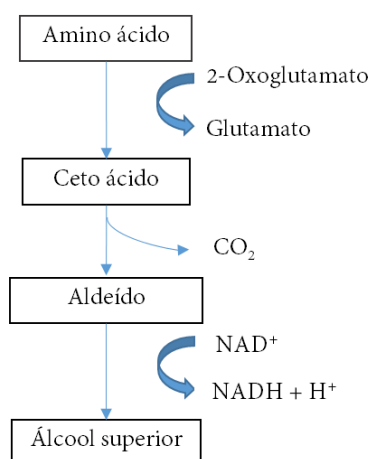


Figura 4- Via metabólica de síntese de álcoois superiores. Adaptado de: (Hazelwood *et al.*, 2008)

Os álcoois superiores são formados através do catabolismo de aminoácidos pela via metabólica de *Ehrlich*, esquematizada na Figura 4. Tendo os variados aminoácidos presentes no mosto e outros biosintetizados pela levedura como ponto de partida, o processo inicia-se com a transaminação desses aminoácidos, resultando no ceto-ácido correspondente. O álcool superior é posteriormente formado através da descarboxilação e redução do ácido mencionado (Hazelwood *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2014). A concentração típica de álcoois superiores em cerveja varia entre 100 e 200 mg.L⁻¹ (Boulton & Quain, 2008). Além da sua importância em termos de aroma e *flavour* da cerveja, os álcoois superiores também desempenham o papel secundário de providenciar precursores para a síntese de ésteres (Suomalainen & Lehtonen, 1979).

Compostos carbonilados

Vários compostos carbonilados surgem durante a produção do mosto, enquanto outros são produzidos durante a fermentação (Andrés-Iglesias *et al.*, 2016). Genericamente, os aldeídos e cetonas contribuem de forma negativa para o perfil sensorial da cerveja, fazendo com que seja importante o controle da fermentação no sentido de minimizar estes compostos no produto final (Saison *et al.*, 2009; Briggs *et al.*, 2004). Os aldeídos são produzidos como produtos intermediários da via metabólica de *Ehrlich* de síntese de álcoois superiores, sendo o acetaldeído o exemplo mais comum (Suomalainen & Lehtonen, 1979). As cetonas, nomeadamente o diacetilo, surgem associadas à síntese de valina e isoleucina, como subprodutos da via anabólica destes aminoácidos (Briggs *et al.*, 2004).

Compostos fenólicos

A concentração de compostos fenólicos presentes na cerveja deriva quase exclusivamente do mosto, porém, o metabolismo da levedura também é responsável pela síntese de uma fracção destes compostos. Várias leveduras têm capacidade de descarboxilar ácidos fenólicos em compostos fenólicos, por exemplo por conversão do ácido p-cumárico em 4-Etil fenol (Suomalainen & Lehtonen, 1979). Estes tipos de compostos são indesejáveis na maioria dos estilos de cerveja, sendo considerados *off-flavours*. Contudo, nalguns estilos, a sua presença é desejável e expectável, por exemplo, o composto fenólico 4-Vinilguaiacol no estilo de cerveja *Weiss* (Walker & Stewart, 2016).

Ésteres

Os ésteres, apesar de estarem presentes na cerveja apenas em concentrações residuais, são os compostos aromáticos de maior relevância produzidos pela levedura (Pires *et al.*, 2014). Devido ao baixo nível de detecção destes compostos, mesmo em concentrações reduzidas, a sua influência na matriz aromática da cerveja é imediata (Saison *et al.*, 2009). Estes compostos são produzidos durante a fase vigorosa da fermentação primária do mosto, envolvendo a condensação química enzimática

entre ácidos orgânicos e álcoois. De modo a possibilitar a sua conversão em ésteres, os ácidos orgânicos devem ser acoplados à coenzima A, formando uma molécula acil-CoA. Em ambiente de anaerobiose, esse ácido orgânico modificado irá ser esterificado com um álcool formando o éster correspondente (e.g. Acetil-CoA + Etanol = Acetato de etilo) (Peddie, 1990; Pires *et al.*, 2014).

Polióis

Dentro desta classe de metabolitos secundários, destaca-se exclusivamente a produção de glicerol (Walker & Stewart, 2016). Este poliól, excluindo o etanol e CO₂, é aquele que revela maiores concentrações na cerveja, sendo que 4 a 10% da fonte de carbono é convertido em glicerol, percentagem condicionada pelo substrato, condições de fermentação e estirpe de levedura (Scanes *et al.*, 1998). O glicerol é produzido em resposta a stress osmótico, como principal soluto compatível, podendo igualmente ser formado com o intuito de restabelecer o equilíbrio

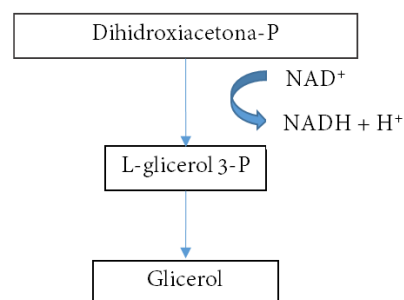


Figura 5- Via metabólica da produção de glicerol. Adaptado de: (Nevoigt & Stahl, 1997)

redox, através da reoxidação de NADH⁻ (Nevoigt & Stahl, 1997). A Dihidroxiacetona-P, precursor da via metabólica da formação de glicerol é providenciada pela degradação glicolítica de açúcares. O esquema da via metabólica do glicerol encontra-se de forma sintética na Figura 5.

2.2.3. Maturação

A maturação compreende todas as transformações levadas a cabo após a fermentação primária (Masschelein, 1986), transformando a cerveja “verde” em cerveja maturada (Boulton & Quain, 2008).

A fermentação primária é finalizada aquando do esgotamento dos açúcares fermentescíveis, sendo que todas as reacções posteriores a esse momento já serão incluídas na etapa de maturação/fermentação secundária (Boulton & Quain, 2008). Durante esta fase ocorre um ajustamento na concentração de compostos indesejáveis, nomeadamente cetonas, acetaldeído e sulfeto de hidrogénio. A diminuição destes compostos decorre tanto da sua purga por arrastamento com dióxido de carbono produzido, como da actividade da levedura, por conversão destes compostos em produtos inócuos do ponto de vista sensorial (Masschelein, 1986; Briggs *et al.*, 2004). A maturação é um processo que envolve frequentemente o abaixamento da temperatura potenciando a clarificação da cerveja por precipitação da levedura floculada e outros sedimentos, nomeadamente proteínas e complexos polifenólicos (Masschelein, 1986). Assim, a maturação é realizada com o propósito de tornar a cerveja num produto estável do ponto de vista microbiológico, físico e sensorial.

A cerveja maturada e devidamente filtrada deve passar ainda por uma fase de ajustamento do nível de carbonatação antes do seu consumo. Apesar da presença de CO₂ dissolvido na cerveja no fim da maturação, a maior parte da quantidade produzida foi libertada, sendo necessário a sua reposição na concentração ideal. A carbonatação da cerveja pode ser forçada, com injeção de CO₂ directamente

na embalagem final. Em alternativa a adição de açúcar numa concentração específica (*priming*), permite a reactivação do metabolismo primário da levedura, levando a produzir CO₂ na quantidade desejada (Vanderhaegen *et al.*, 2003).

2.3. Importância da levedura no perfil sensorial da cerveja

Indubitavelmente, o papel que a levedura desempenha no desenvolvimento sensorial da cerveja é insubstituível, devendo a cerveja grande parte da sua complexidade à actividade da levedura durante a fase fermentativa e de maturação. (Boulton & Quain, 2008)

O papel da levedura estende-se para além da simples conversão de açúcares fermentescíveis em etanol e dióxido de carbono. Como já foi mencionado no ponto 2.2.2., a levedura actua em diversos planos para o desenvolvimento sensorial da cerveja. Não descartando a influência das outras matérias-primas básicas descritas no ponto 2.1.3., a levedura, a título individual, é o elemento de maior preponderância na produção e/ou conversão de compostos aromáticos e de *flavour*.

Centenas de compostos de *flavour* ou aroma activo são extraídos e/ou sintetizados ao longo do processo de produção de cerveja. Todavia, a grande maioria dessas substâncias são produzidas durante a fase fermentativa, como sub produtos ou produtos intermediários do metabolismo da levedura (Pires *et al.*, 2014). (Meilgaard *et al.*, 1979) criaram um documento conhecido como a “roda dos sabores”, no qual incluíram os compostos e descritores mais frequentemente associados à cerveja (Figura 6). Segundo (White, 1998), 59% dos descritores de aroma e 79% dos descritores de *flavour* podem ser atribuídos directamente à actividade da levedura, decorrentes da conversão de compostos presentes no mosto.

Consegue-se então estabelecer uma relação inegável e directa entre a actividade da levedura e a produção de compostos aromáticos e de *flavour*. Além do extenso leque de produtos metabólicos que produz, também age como intermediária na bioconversão de precursores não-voláteis e inodoros em compostos de aroma activo, libertando o potencial organoléptico do mosto (Basso *et al.*, 2016; Steensels & Verstrepen, 2014). De igual modo, é importante a sua função na atenuação de compostos indesejáveis e em última análise no equilíbrio final do perfil sensorial da cerveja.

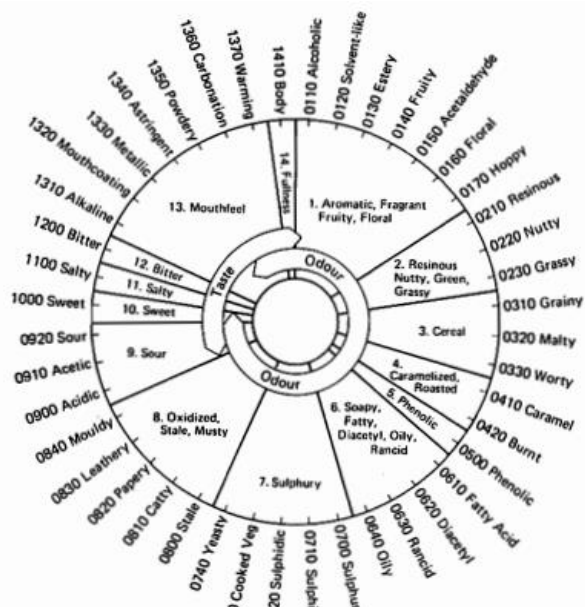


Figura 6- Roda dos sabores da cerveja. Fonte: (Meilgaard *et al.*, 1979)

2.4. Microbiota da cerveja

Neste subcapítulo a descrição das leveduras convencionais e não-convencionais associadas a cerveja irá incidir fundamentalmente nas suas características fenotípicas. Assim, serão utilizados os seguintes critérios de distinção entre tipos de levedura: morfologia das colónias; aparência microscópica; características fermentativas (incidência na formação de compostos de aroma e flavour); temperatura de crescimento; e padrão de consumo de açúcares.

2.4.1. Género *Saccharomyces*

As estirpes de leveduras cervejeiras clássicas são fungos unicelulares ascomicetos pertencentes ao género *Saccharomyces* (Briggs *et al.*, 2004). O complexo de espécies *sensu stricto* do género *Saccharomyces* inclui as estirpes de leveduras mais relevantes para a indústria das fermentações (Rainieri *et al.*, 2003). Este complexo alberga, para além das espécies cervejeiras *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*, cinco outras espécies naturais: *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. arboricolus*, *S. kudriavzevii*, e *S. bayanus* (Rainieri *et al.*, 2003; Scannell *et al.*, 2011).

A utilização (quase) exclusiva de estirpes *Saccharomyces* em fermentações controladas ao longo da História pode ser fundamentada por três características fenotípicas que este género exhibe: produção eficiente de elevadas quantidades de etanol; utilização da fermentação como via metabólica preferencial, combinada com efeito *Crabtree* positivo; e elevada tolerância a etanol e/ou stresses abióticos (Basso *et al.*, 2016).

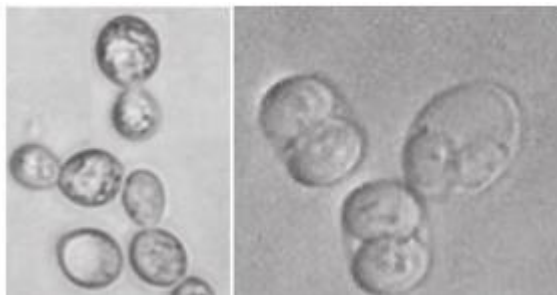
Em termos de relevância para a indústria cervejeira destacam-se duas espécies deste género: *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*, existindo uma grande variedade de estirpes domesticadas destas espécies.

2.4.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae é, desde o início do século XX, reconhecida e estudada como um sistema modelar no campo dos seres eucariotas unicelulares (Schneiter, 2004), sendo indubitavelmente a levedura mais bem estudada, e provavelmente um dos organismos unicelulares mais extensamente estudados (Briggs *et al.*, 2004).

A diversidade genética das estirpes comerciais de *S. cerevisiae* reflecte o culminar de séculos de utilização e adaptação em ambientes industriais (cervejarias, adegas, padarias) (Fay & Benavides, 2005). Consequentemente, a sua valorização na indústria das fermentações é ubíqua e plena, expressando variadas características como: fermentação rápida e completa de açúcares; a produção e tolerância a elevadas concentrações de etanol; a formação de compostos de aroma e flavour desejados em quantidades moderadas; a capacidade de utilização de mono-, di- e tri-sacarídeos; e o favorecimento do metabolismo fermentativo em detrimento da respiração (Dequin, 2001; Walker & Stewart, 2016). Apesar destas características fenotípicas individuais serem transversais, em maior ou menor grau, noutros géneros de leveduras, a combinação e afinação das mesmas em *S. cerevisiae* e

espécies similares, são únicas, tornando-a na espécie fermentativa por excelência (Steensels & Verstrepen, 2014).



A sua morfologia é oval, elipsoidal ou cilíndrica, ocorrendo singularmente ou em pares, ocasionalmente em pequenas cadeias ou aglomerados (Figura 7), com dimensões médias, apesar de dependente da estirpe, de: 2.5-4.5 x 10.5-20 µm (Kurtzman *et al.*, 2010) pg 738.

Figura 7- *Saccharomyces cerevisiae*. Fonte: (Kurtzman *et al.*, 2010)

A espécie *S. cerevisiae* por ser historicamente mais significativa que a *S. pastorianus*, no sentido da antiguidade da sua utilização, a diversificação de estirpes é superior (Vidgren, 2010). No que diz respeito aos produtos metabólicos secundários decorrentes da actividade fermentativa, devido ao elevado número de estirpes desta espécie a generalização é difícil, sendo demasiado estirpe-dependente. Contudo, devido à temperatura óptima de crescimento superior, as estirpes de *S. cerevisiae* são reconhecidas pela produção elevada de compostos aromáticos face à produção destes compostos por estirpes de *S. pastorianus* (Peddie, 1990; Hiralal *et al.*, 2014).

2.4.1.2. *Saccharomyces pastorianus*

O genótipo híbrido de *Saccharomyces pastorianus* (cruzamento *S. cerevisiae* e *S. eubayanus*) tem sido sugerido como fundamento da maior resistência desta espécie a vários tipos de stresses como temperatura e valores baixo de pH, elevada concentração de álcool, pressão osmótica e ambiente anaeróbio (Querol & Bond, 2009).

S. pastorianus é responsável pela produção de cervejas do tipo *Lager*, o estilo mais popular de cerveja do mundo (Willaert, 2012). Esta espécie fermenta a uma temperatura inferior (7-15°C) e além da capacidade de assimilação de melibiose, difere de *S. cerevisiae* pela utilização mais eficiente de maltotriose, resultando em cervejas com menor concentração de açúcares residuais (Walker & Stewart, 2016). Esta espécie de levedura não exhibe crescimento acima de 34°C (Briggs *et al.*, 2004; Boulton & Quain, 2008). A fermentação e maturação levada a cabo por esta espécie de levedura é normalmente caracterizada pela formação de uma cerveja de carácter “limpo” e pouco aromático (Krogerus *et al.*, 2015). Simultaneamente, *S. pastorianus* é reconhecida pela maior produção de diacetilo,



Figura 8- *Saccharomyces pastorianus*. Fonte: (Kurtzman *et al.*, 2010)

dimetilsulfureto e sulfureto de hidrogénio, *off-flavours* correntes no estilo *Lager*, sendo portanto pertinente uma etapa de maturação prolongada de modo a possibilitar que a actividade da levedura conclua a conversão desses compostos noutros de menor aroma (Wendland, 2014). A sua morfologia microscópica é essencialmente idêntica à de *S. cerevisiae* (Figura 8), sendo que as células são igualmente globosas, elipsoidais ou cilíndricas com dimensões médias entre 2.2-8 x 3.5-13.5 µm (Kurtzman *et al.*, 2010).

2.4.2. Géneros não-*Saccharomyces*

A vasta maioria das cervejas recorrem exclusivamente a estirpes do género *Saccharomyces* para a condução do processo fermentativo, sendo a presença de qualquer outra levedura considerada um defeito. Contudo, algumas cervejas selectas, cuja popularidade é cada vez mais evidente, incorporam inóculos secundários de leveduras não-*Saccharomyces* (Bokulich & Bamforth, 2013).

2.4.2.1. *Dekkera bruxellensis*

Esta levedura encontra-se vulgarmente associada à deterioração e/ou produção de *off-flavours* em bebidas alcoólicas, nomeadamente no vinho (Schifferdecker *et al.*, 2014; Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). No entanto, a sua utilização dentro da indústria cervejeira apresenta contribuições positivas, até essenciais, para estilos específicos de cerveja (Crauwels *et al.*, 2015; Steensels *et al.*, 2015). O género *Dekkera/Brettanomyces* há várias décadas que tem sido isolado a partir de fermentações espontâneas de cerveja, sendo das leveduras não-convencionais mais relevantes para o cenário cervejeiro. É sabido que este tipo de leveduras desempenha um importante papel na formação do perfil sensorial de cervejas azedas, e.g. *Lambic* e *Gueuze* (Basso *et al.*, 2016).

D. bruxellensis é descrita como sendo *crabtree* positiva e anaeróbia facultativa, acumulando etanol e ácido acético durante a fermentação (Rozpędowska *et al.*, 2011). *D. bruxellensis* cresce optimamente entre 19°C e 35°C, não exibindo crescimento acima de 45°C. As colónias exibem uma coloração que difere do creme até ao castanho claro, frequentemente brilhantes e cremosas (Schifferdecker *et al.*, 2014).

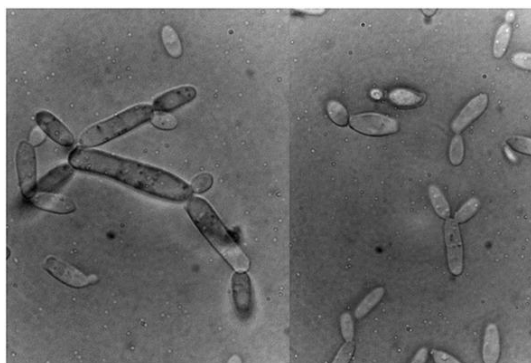


Figura 9- *Dekkera bruxellensis*. Fonte: (Schifferdecker *et al.*, 2014)

A caracterização morfológica do género *Dekkera* é algo subjectiva, encontrando-se diversas descrições da forma que assume (Stender *et al.*, 2001). As células observadas são normalmente ovais, elipsoidais, frequentemente cilíndricas e alongadas, por vezes com a forma de “bala” (Figura 9). Dimensões correntes: 2-7 x 3,5-28 µm (Kurtzman *et al.*, 2010).

D. bruxellensis é capaz de fermentar maltose e frutose, apesar de o fazer a um ritmo menor quando comparado com glucose (Steensels *et al.*, 2015).

Igualmente importante para a indústria cervejeira é a capacidade do género *Dekkera* de degradar e fermentar açúcares complexos, através da produção da enzima α -glucosidase. Celibiose e dextrinas como a maltotetraose e maltopentaose são fermentadas por leveduras do género *Dekkera*, diminuindo drasticamente o nível de açúcares residuais presentes na cerveja e reduzindo subsequentemente o valor calórico (Kumara & Verachtert, 1991).

Para além de apresentarem características que possibilitam um bom rendimento durante a fermentação alcoólica, incluindo tolerância a pressão osmótica, etanol, baixas pressões de oxigénio e valores baixos de pH, o metabolismo da espécie *D. bruxellensis* é diversificado, conduzindo a resultados

organolépticamente interessantes na produção de cerveja (Steensels *et al.*, 2015; Steensels & Verstrepen, 2014).

Estas leveduras são responsáveis pela produção de um leque de compostos de *flavour*, nomeadamente etil fenol, etil guaiacol, ácido isovalérico, ácido acético e acetato de etilo (Vanderhaegen *et al.*, 2003; Basso *et al.*, 2016). Em termos de produção de compostos aromáticos, para além da produção de notas fenólicas típicas desta espécie, várias estirpes revelam uma contribuição significativa para o carácter frutado e floral da cerveja, através da produção de elevadas concentrações de acetato de etilo, caproato de etilo, caprilato de etilo e lactato de etilo. Todavia, este género de levedura é igualmente reconhecido pela produção, dependendo claro das condições de fermentação, de aromas desagradáveis como “suor de cavalo”, “medicinal” ou “fecal” (Crauwels *et al.*, 2015; Basso *et al.*, 2016). Para além disso, existem estirpes de leveduras *Dekkera* que, devido à produção de enzimas β -glucosidases, conseguem libertar compostos de aroma e *flavour* activos derivados do lúpulo, que se encontram bloqueados por ligações glicosídicas. As estirpes comuns de *S. cerevisiae* não possuem capacidade de produção deste tipo de enzimas, tornando a utilização do género *Dekkera* vantajosa na produção de bebidas alcoólicas inovadoras, enriquecendo o seu perfil sensorial (Crauwels *et al.*, 2015).

2.4.2.2. *Kloeckera apiculata*

Kloeckera apiculata é uma espécie de levedura normalmente associada à fermentação inicial de mosto de uva, sendo esta associação a que foi mais intensamente estudada, mais precisamente, na sua contribuição positiva no desenvolvimento do perfil aromático de vinho (Sosa *et al.*, 2008). A sua associação com cerveja é muito limitada, praticamente inexistente, havendo, no entanto, extensos estudos sobre a actividade deste tipo de levedura em substratos diversos: sumo de maçã, uva e agave (Díaz-Montañó *et al.*, 2008; Escalante & Escalante, 2012; Zohre & Erten, 2002).

Kloeckera apiculata corresponde ao estado assexuado (anamorfo) e imperfeito do género *Hanseniaspora uvarum* (Escalante & Escalante, 2012). O género é conhecido pela sua morfologia característica, com células apiculadas (forma que termina abruptamente num pico definido), esféricas ou alongadas (Figura 10), de dimensões 1,5-5 x 2,5-11,5 μm (Kurtzman *et al.*, 2010, pg.430). A sua temperatura óptima de crescimento situa-se entre 25-30°C, não exibindo crescimento acima de 37°C. A morfologia das colónias (meio de crescimento YPD) é cremosa e brilhante, ligeiramente elevada no centro, de coloração branca a creme.

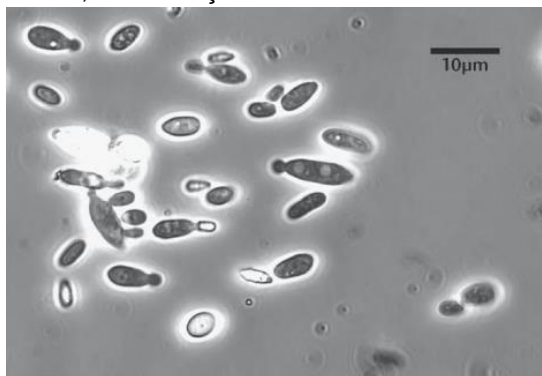


Figura 10- *Kloeckera apiculata*. Fonte: (Fugelsang & Edwards, 2007) pg.6

O género *Kloeckera* apenas fermenta glucose e frutose, sendo a utilização deste último açúcar variável entre estirpes (Díaz-Montañó & Córdova, 2009). Este género é reconhecido pela quantidade e qualidade de compostos voláteis produzidos durante a fermentação do vinho (Díaz-Montañó *et al.*, 2008). As leveduras *K. apiculata* são anaeróbias facultativas e *crabtree* negativas exibindo preferência pelo metabolismo oxidativo em detrimento da fermentação na presença de

oxigênio (Díaz-Montaño & Córdova, 2009; Venturin *et al.*, 1995). Em ambiente anaeróbio a fermentação alcoólica levada a cabo por este tipo de levedura é caracterizada pela produção de elevadas concentrações de glicerol, ácido acético, acetato de etilo, propionato de etilo, acetato de propilo e cetonas, nomeadamente acetoína (Escalante & Escalante, 2012; Díaz-Montaño & Córdova, 2009). Em termos comparativos com *S. cerevisiae*, as estirpes de *Kloeckera* produzem concentrações inferiores de etanol e de álcoois superiores (Romano *et al.*, 2003; Ciani e Picciotti, 1995).

Apesar de leveduras apiculadas, nomeadamente *K. apiculata*, não demonstrarem capacidade fermentativa tão elevada como *S. cerevisiae*, o interesse da sua utilização advém da capacidade de biosintetizar ou libertar compostos aromáticos presentes no substrato (Díaz-Montaño & Córdova, 2009).

2.4.2.3. *Torulaspora delbrueckii*

Torulaspora delbrueckii é, actualmente, das leveduras de maior importância dentro das leveduras não-*Saccharomyces*, surgindo nos últimos anos diversos estudos em fermentações controladas de vinho e de pão, em que a co-inoculação da mesma com *S. cerevisiae* revela resultados promissores (Alves-Araújo *et al.*, 2007; Loira *et al.*, 2015; Renault *et al.*, 2009).

A espécie *Torulaspora delbrueckii* é caracterizada pela pureza da sua fermentação, revelando, por isso, baixa produção de glicerol, acetaldeído, ácido acético, acetoína e acetato de etilo (Renault *et al.* 2009). O impacto positivo desta levedura, além da minimização da síntese de compostos indesejáveis corrigindo certos defeitos em vinhos, surge através do enaltecimento da fracção aromática decorrente da produção de diversos ésteres (Bely *et al.*, 2008; Loira *et al.*, 2014).

O padrão de consumo de açúcares e sua regulação no género *Torulaspora* são muito semelhantes aos descritos para *S. cerevisiae*. Porém, o ritmo de fermentação é claramente inferior e com menor rendimento em etanol (Alves-Araújo *et al.*, 2007; Bely *et al.*, 2008). *T. delbrueckii* apresenta uma moderada variabilidade no padrão de fermentação consoante a estirpe (Renault *et al.*, 2009; Basso *et al.*, 2016). Contudo, de forma geral, as estirpes deste tipo de levedura exibem um consumo sequencial de açúcares, tendo capacidade de assimilação e fermentação de glucose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose (Alves-Araújo *et al.*, 2007; Tataridis *et al.*, 2013; Basso *et al.*, 2016).

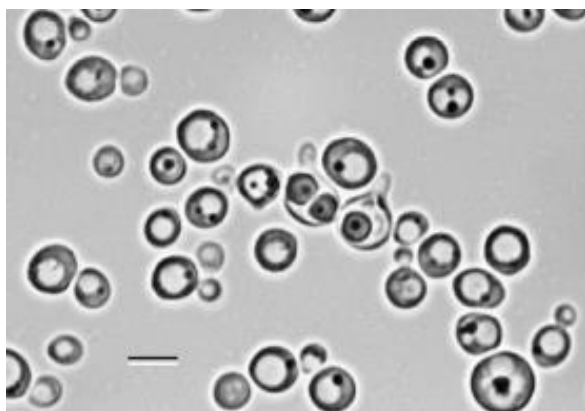


Figura 11- *Torulaspora delbrueckii*. Fonte: (Kurtzman *et al.*, 2010)

Apesar do foco de investigação desta levedura recair sobre o vinho e pão, recentemente foram realizados estudos de co-inoculação de *T. delbrueckii* com *S. cerevisiae* em mosto de cerveja (Tataridis *et al.*, 2013; Canonico *et al.*, 2016). Os resultados, de forma geral, revelam efeitos semelhantes aos obtidos em vinhos: produção acrescida de ésteres, essencialmente hexanoato de etilo, octanoato de etilo e acetato de fenil etilo; redução na concentração final de etanol e glicerol; e, apesar de contrariar evidências anteriores, ligeiro aumento na

produção de ácido acético.

A espécie *T. delbrueckii* possui uma elevada resistência a baixas temperaturas, todavia, o intervalo óptimo de crescimento situa-se entre 25-30°C (Alves-Araújo *et al.*, 2007). Como se pode observar na Figura 11, a sua morfologia é frequentemente esférica, por vezes elipsoidal, com dimensões de: 2.1-5.6 x 3-6.6 µm. As colónias em meio de crescimento YPD possuem uma coloração branca, são ligeiramente convexas com centro deprimido e margem suave (Kurtzman *et al.*, 2010).

2.4.2.3. Outras leveduras não convencionais

Os estudos conduzidos com leveduras não-convencionais em cerveja ainda são limitados. Para além das leveduras já mencionadas, a literatura destaca essencialmente *Pichia kluyveri* e em menor grau *Wickerhamomyces anomalus* como leveduras com potencial de co-inoculação ou fermentações sequenciais em cerveja (Sarens & Swiegers, 2014; Basso *et al.*, 2016).

O efeito combinado da fermentação sequencial de *P. kluyveri* e *S. cerevisiae* com a adição de diferentes variedades de lúpulos em cerveja, demonstrou um incremento na produção de vários ésteres desejáveis (isoamil acetato e acetato isobutil), contribuindo positivamente para o perfil aromático da cerveja (Sarens & Swiegers, 2014).

No caso de *W. anomalus*, estudos conduzidos em vinho e cidra apontam igualmente para um potencial inexplorado em termos de formação de compostos voláteis (Ye *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2003). Deve-se salientar que, à semelhança do género *Dekkera*, esta levedura tem capacidade de síntese de β-glucosidase, cuja actividade permite a libertação eficaz de compostos de aroma. (Basso *et al.*, 2016; Swangkeaw *et al.*, 2009).

Por último, o estudo levado a cabo por (Gibson *et al.*, 2013) avaliou o potencial de diversas estirpes “selvagens” de leveduras na produção de cervejas, em regime de fermentação sequencial. As leveduras *Kazachstania servazzi* e *Naumovia dairenensis* demonstraram ser as mais promissoras do grupo, produzindo cervejas aromaticamente mais complexas, quando comparadas com o controlo.

Muitas outras leveduras de géneros não-*Saccharomyces* e estirpes não-comerciais de *Saccharomyces* poderão ser candidatas para co-inoculação/fermentação sequencial de cerveja, porém o estado da literatura ainda é limitado neste segmento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Estirpes e matérias-primas utilizadas

3.1.1. Estirpes de leveduras e condições de crescimento

As estirpes de leveduras utilizadas nos ensaios fermentativos encontram-se listadas na Tabela 4, incluindo o substrato de isolamento das estirpes não-convencionais e a empresa de origem das leveduras comerciais.

Tabela 4- Estirpes de leveduras utilizadas nos ensaios

Estirpe	Código ISA	Código PYCC	Substrato de isolamento/empresa de fabrico	T°C fermentação
<i>Dekkera bruxellensis</i>	1649	4179	Cerveja <i>Lambic</i>	25-35
<i>Dekkera bruxellensis</i>	1655	5162	Cerveja <i>Stout</i>	25-35
<i>Kloeckera apiculata</i>	1861	4193	Uvas moscatel	25
<i>Pichia kluyveri</i> *	1439	3801	Azeitonas	25-35
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1376	-	Cerveja holandesa	25-30
<i>S. pastorianus Lager</i>	-	-	Brewferm	10-15
<i>S. cerevisiae Safale S-04</i>	-	-	Fermentis	18-24
<i>S. cerevisiae Blanche</i>	-	-	Brewferm	18-24
*posteriormente identificada como <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .				

Será utilizada a partir deste momento a seguinte designação/código para as distintas leveduras mencionadas na Tabela 4: *D. bruxellensis* ISA1649 – **DL**; *D. bruxellensis* ISA1655 – **DS**; *K. apiculata* ISA1861 – **K**; *P. Kluyveri* ISA1439– **P**; *T. delbrueckii* ISA1379– **T**; Lager Brewferm – **LB**; Safale S-04 – **S-04**; Blanche Brewferm – **BB**.

As leveduras não-convencionais adquiridas através do banco de leveduras do ISA foram cultivadas em meio sólido YPD (extracto de levedura 0,5% (m/v), peptona 1% (m/v), glucose 2% (m/v), agar 2% (m/v)), incubadas a 28°C até crescimento visível das colónias e mantidas posteriormente a 4°C. As estirpes comerciais desidratadas foram adquiridas na loja LX Brewery, Lda e igualmente mantidas a 4°C antecedendo a sua utilização. Sempre que necessário, ou seja, antes da sua inoculação no mosto, foi preparada uma suspensão de células, inoculando uma ansada de biomassa de cada uma das culturas em meio líquido de YPD (extracto de levedura 0,5% (m/v), peptona 1% (m/v), glucose 2% (m/v)). As suspensões foram incubadas a 28°C com agitação orbital 130 rpm, durante 24-48h até DO_{640nm} suficiente para inoculação.

3.1.2. Malte

Os maltes foram obtidos na empresa LX Brewery, Lda provenientes do fornecedor *Castle Malting* (Bélgica), sendo que a moagem da mistura de maltes foi realizada com recurso ao moinho Piccolo 15 S 400V (Sommer, Alemanha). Os diferentes tipos de maltes base e de especialidade utilizados na

produção dos três estilos de cerveja encontram-se listados no Anexo I, bem como as quantidades utilizadas durante a brassagem.

3.1.3. Lúpulo

Os lúpulos foram obtidos na empresa LX Brewery, Lda, provenientes igualmente do fornecedor *Castle Malting* (Bélgica), e armazenados a vácuo e a -18°C de modo a minimizar a volatilização de aromas, antecedendo a sua utilização na brassagem. As quantidades e tipos de lúpulos utilizados encontram-se no Anexo I.

3.2. Ensaaios fermentativos

3.2.1. Produção do mosto

Foram produzidos cerca de 20L de mosto de estilo *Stout*, *Weiss* e *Dunkel*, recorrendo ao equipamento Braumeister 20L (Speidel, Alemanha) (Figura 12A). O programa detalhado de brassagem, específico para cada estilo, encontra-se no Anexo I.

A)



B)



Figura 12 – Equipamento utilizado na produção do mosto de cerveja.

A) Braumeister 20L – Panela com sistema eléctrico utilizada durante a brassagem do malte. B) Arrefecedor em serpentina utilizado para arrefecer o mosto. Fonte: (Beer Infinity, 2014; Alibaba Group, 2017)

Para os três estilos de cerveja, o volume inicial de água da brassagem foi cerca de 18 L, utilizando 7L para água de *sparging* a 70°C. Foi utilizada água LUSO em todas as fases do processo. Finalizada a fase de empastagem, foi promovida a centrifugação do mosto com auxílio de uma pá desinfectada, de modo a que o sedimento formado na fase de ebulição se concentrasse no centro do equipamento. O arrefecimento do mosto, após

a finalização da fase de ebulição, foi levado a cabo com um arrefecedor em serpentina de aço inoxidável (Figura 12B). Assim que a temperatura do mosto atingiu os 25°C, este foi vertido, de certa distância, promovendo a oxigenação do mosto, para um balde fermentador e posteriormente utilizado nos diversos ensaios. O volume de mosto que não foi imediatamente inoculado, foi distribuído por garrações de plástico de 5L e congelado a -80°C para eventuais repetições dos ensaios fermentativos.

3.2.2. Fermentação do mosto

As fermentações foram conduzidas, em duplicado, em frascos *Schott* de um litro previamente esterilizados e adaptados com um borbulhador improvisado (Figura 13), nos quais 800 mL de mosto foram inoculados com a levedura devida, cinco não-convencionais e uma comercial de controlo. Nos ensaios fermentativos inoculados com leveduras não-convencionais, ao fim de 48 horas, no caso dos mostos *Stout* e *Weiss*, e 96 horas, no caso do mosto *Dunkel*, foi inoculada a estirpe comercial respectiva ao estilo.



Figura 13- Ensaios fermentativos do mosto *Weiss*

A absorvância dos *starters* de leveduras desenvolvidos sob as condições referidas no ponto 3.1.1. foi determinada a 640_{nm} com recurso ao espectrofotómetro Ultrospec2100pro (Amersham Biosciences, Reino Unido), de modo a definir a concentração em biomassa e subsequentemente o volume de inóculo a adicionar em cada ensaio. Após a determinação do valor das absorvâncias e tendo em conta que o valor de absorvância de 1 equivale a uma concentração de $3,3 \times 10^7$ cel.mL⁻¹, determinou-se o volume de cada suspensão de forma a obter 1×10^6 cel.mL⁻¹ em cada frasco. No caso da levedura comercial inoculada posteriormente utilizou-se o mesmo procedimento.

No caso da cerveja *Stout* e da *Weiss*, a fermentação decorreu a uma temperatura controlada de 25°C durante sete dias, enquanto que para o estilo *Dunkel*, a temperatura de fermentação foi de 15°C durante as primeiras 48h e de 12°C durante o restante tempo, perfazendo um total 14 dias de fermentação. Ainda especificamente para a cerveja *Dunkel*, após os primeiros 14 dias de fermentação, realizou-se a transfega dos ensaios para fermentadores secundários (idênticos aos já descritos) permanecendo mais 14 dias a 5°C em fermentação secundária antes de serem engarrafados.

3.2.3. Engarrafamento e maturação

Finalizado o período de fermentação definido, os frascos foram reservados durante 24 horas a 5°C de forma a potenciar a deposição de impurezas e leveduras, auxiliando na clarificação da cerveja. Após esse período, os ensaios foram engarrafados em garrafas com volume 200 mL (para prova preliminar) e de 500mL (para análise sensorial). De forma a possibilitar a carbonatação da cerveja, adicionou-se em cada garrafa uma solução aquosa de sacarose (açúcar branco, Continente). A concentração dessa solução e volume a adicionar em cada garrafa foi calculado de modo a atingir uma concentração final na cerveja de 3,75 g de sacarose.L⁻¹ para o estilo *Stout* e de 7,5 g de sacarose.L⁻¹ para os estilos *Weiss* e *Dunkel*. Esta concentração de sacarose, que permitiu a carbonatação adequada das cervejas, foi determinada com o auxílio da ferramenta on-line *Beer Priming Calculator* (Brewer's Friend, 2013).

A cerveja engarrafada foi deixada a maturar a 20 °C durante 15 dias, no caso dos estilos *Stout* e *Weiss*, e a 12 °C, durante 7 dias, para o estilo *Dunkel*.

3.3. Análise microbiológica

O acompanhamento da fermentação a nível microbiológico foi realizado com uma cadência diária. Amostras do mosto foram retiradas para *ependorfs* de 2 mL, dentro da câmara de fluxo laminar de modo a minimizar contaminações possíveis, e após homogeneização da suspensão, de modo a não comprometer a representatividade da amostra.

3.3.1. Determinação do número de células viáveis e células totais

A contagem de leveduras para acompanhamento do seu crescimento foi maioritariamente realizada com recurso ao hemocitómetro. Tendo em conta a previsão do número de células de leveduras no mosto, a amostra foi diluída em água miliQ, adicionando-se reagente azul metileno em volume idêntico ao da amostra diluída (1:1). A mistura foi deixada repousar durante 15 minutos antes da sua observação ao microscópio. O reagente azul metileno tinge de coloração azul as células não-viáveis, permanecendo incolores aquelas viáveis em resultado da redução do corante. Assim sendo, procedeu-se à contagem das leveduras viáveis e não-viáveis visíveis dentro da quadrícula central do hemocitómetro, composta por 25 quadrados de tamanho idêntico, que no total comporta um volume de 0,1 mm³.

3.3.2. Determinação do número de células viáveis e cultiváveis

Como complemento à informação recolhida no hemocitómetro, também recorreu-se ao plaqueamento por espalhamento de amostras em meio sólido YPD. Para tal, realizaram-se diluições decimais seriadas das amostras e procedeu-se à inoculação das diluições mais passíveis de revelarem um número de UFCs dentro do intervalo 30-300. O plaqueamento foi sempre realizado em duplicado, utilizando pelo menos duas diluições por cada ensaio fermentativo. As placas inoculadas foram incubadas 5 dias a 28°C para os ensaios inoculados com as estirpes de *D. bruxellensis* e entre 2-3 dias para os restantes ensaios.

As mesmas amostras foram também inoculadas em placas de meio selectivo para as leveduras não-convencionais (excepção da estirpe do género *Torulaspora*). O meio selectivo utilizado resultou da adição do antibiótico cicloheximida numa concentração final de 10 mg.L⁻¹ a meio YPD agar, de forma a bloquear o crescimento de leveduras do género *Saccharomyces*, sendo que foram incubadas nas condições descritas anteriormente para meio YPD sem antibiótico. O número de células da estirpe comercial *Saccharomyces* nos ensaios co-inoculados foi obtido pela diferença entre o número de UFCs nas placas YPD e nas placas selectivas (YPD+cicloheximida)

3.4. Análise química

Paralelamente à análise microbiológica, foram realizadas análises químicas com cadência regular ao longo da fermentação e ao produto final pós-maturação.

3.4.1. Determinação brix

O °brix foi determinado com recurso ao refractómetro HI 96801 ATC (Hanna, Inglaterra) com capacidade de medição entre 0-85%. A amostra foi previamente agitada no vórtex e de seguida colocou-se 75 µL de amostra no suporte de leitura do refractómetro. Foram feitas três leituras de cada amostra, sendo que o resultado final apresentado reflecte a média dessas réplicas. Sempre que necessário o dispositivo foi calibrado com água desmineralizada.

3.4.2. Determinação pH

O valor de pH foi determinado recorrendo-se a um eléctrodo de pH (Broadley James Corporation, Inglaterra) ligado ao potenciómetro pH82 (Merck, EUA). Sempre que necessário calibrou-se o eléctrodo com soluções tampão de pH 7 e 4 (Sigma-Aldrich, EUA).

3.4.3. Determinação açúcares e ácidos orgânicos (HPLC)

As amostras para HPLC foram recolhidas de forma idêntica às recolhidas para análise microbiológica, sendo imediatamente congeladas até tratamento e injeção no cromatógrafo de HPLC.

Previamente à injeção no cromatógrafo, as amostras a analisar foram descongeladas e tratadas. Após a sua descongelação à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 16000 *g* durante 10 minutos, recuperando-se o sobrenadante, tendo-se depois adicionado ácido perclórico (70% (v/v), Merck) numa concentração de 30 µL.mL⁻¹ de amostra, e colocado as amostras em gelo durante 30 minutos. Findo esse período, as amostras foram novamente centrifugadas 10 minutos a 16000 *g*, recuperando-se o sobrenadante que foi depois filtrado usando filtros *Milipore* de 0,22 µm de diâmetro de poro (BGB-Analytik, EUA) para o tubo/vial de amostra do cromatógrafo.

O cromatógrafo de HPLC utilizado inclui: forno com controlador de temperatura (CROCO-CIL, Portugal); sistema de bomba de injeção (515 HPLC Pump, Waters) com módulo de controlo (pump control module I, Waters); coluna de exclusão iónica para análise de açúcares e ácidos orgânicos (SUGAR SH1011, Shodex); injetor automático (Autosampler 717 plus, Waters) e um detector de índice de refração (Refractive Index Detector 2414, Waters).

Foram realizadas corridas, em triplicado, de 30 minutos por cada injeção. O processo foi conduzido com a coluna a 50°C e a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ de ácido sulfúrico 5 mM, sendo introduzidos no sistema 10 µL de amostra em cada injeção. O eluente (fase móvel) mencionado foi preparado com água miliQ a partir de uma solução 5x concentrada (25 mM) de ácido sulfúrico (BDH, Inglaterra) previamente filtrada (membrana 47 mm de diâmetro, porosidade de 0,2 µm) sob vácuo, e seguidamente desarejado, igualmente em sistema de vácuo, sob agitação com recurso a íman e placa magnética.

Previamente à injeção de amostras de mosto/cerveja foram ainda realizadas curvas de calibração com o intuito de determinação da concentração dos compostos de interesse nas amostras. Realizaram-se 10 curvas de calibração para os seguintes compostos de interesse: glucose (BDH), maltose (Sigma-Aldrich), maltoriose (Sigma-Aldrich), glicerol (Sigma-Aldrich), etanol (Merck), ácido málico (Sigma-Aldrich), ácido succínico (BDH), ácido cítrico (Sigma-Aldrich), ácido láctico (Fluka) e ácido acético (Merck). Utilizando reagentes pró-análise e a partir de soluções-mãe concentradas destes compostos, foram realizadas diluições com concentrações gradualmente inferiores. As curvas de calibração foram construídas a partir dos resultados das injeções dessas soluções (Anexo II). As soluções das curvas de calibração dos distintos compostos sofreram o mesmo tratamento acima descrito previamente à sua injeção no aparelho de HPLC.

3.4.4. Análise compostos voláteis (GC-FID)

O perfil aromático das amostras de cervejas foi analisado com recurso a cromatografia gasosa. Foram definidos os seguintes compostos voláteis de interesse para quantificação: 2- fenil etanol, álcool isoamílico; isobutanol; álcool amílico; acetato isoamílico; acetaldeído; 2,3- butanediol; 4- etil fenol; e 4- etil guaiacol. As curvas de calibração realizadas para a quantificação dos compostos voláteis mencionados encontram-se no Anexo III. Estas curvas de calibração dos compostos foram realizadas a partir de soluções-mãe concentradas, utilizando diclorometano como solvente, cuja diluição progressiva originou os pontos das curvas para os compostos pretendidos.



Figura 14 - Vials de 2 mL de injeção GC. Fonte: (Agilent Technologies, 2017)

De modo a isolar a fracção aromática da cerveja recorreu-se a extracção líquida com solvente orgânico diclorometano. Foi adicionado 0,35 g de NaCl a 1 mL de amostra de cerveja e após agitação no vórtex, adicionou-se 0,25 mL de diclorometano. As amostras foram novamente agitadas no vórtex e seguidamente centrifugadas a 5°C durante 3 minutos a 10620 g. A fase mais densa (inferior) foi recolhida para vials 2mL (Figura 14), repetindo-se o processo de adição do solvente, agitação, centrifugação e recuperação da fase de interesse até completar 1 mL de solução no vial. As amostras e os vials com a fase recuperada foram mantidos em gelo durante o processo de extracção de forma a minimizar evaporação de compostos voláteis. As extracções líquidas foram realizadas em duplicado

para cada amostra, sendo adicionado a uma das réplicas 10 µL de cada solução padrão concentrada (10 g.L⁻¹) dos compostos acima mencionados.

A análise cromatográfica dos extractos obtidos foi efectuada no aparato Varian CP 3800 GC-FID (Agilent J&W, EUA), com uma coluna capilar VF-5ms (Agilent J&W, EUA) de 30m de comprimento, diâmetro interno 0,25 mm e espessura do filme 0,25 µm.

Os patamares de temperatura do forno da coluna foram os seguintes: subida de 50°C a 215°C à taxa de 10°C.min⁻¹; subida de 215°C a 250°C à taxa de 20°C.min⁻¹; 250°C durante 10 min; descida de 250°C a 50°C em 2 min. Detector de ionização por chama (FID) a 250°C. A temperatura do injector manteve-

se a 230°C, em modo split ON. O gás de transferência utilizado foi Hidrogénio com um caudal de 30 mL.min⁻¹. Foram injectados 2 µL das amostras, em corridas duplicadas de 20 minutos.

3.5. Análise sensorial

A prova sensorial das cervejas foi conduzida com um painel de 10 cervejeiros/provadores de cerveja experientes com idades compreendidas entre os 26-53 anos e maioritariamente do sexo masculino (80%). Foram analisadas sensorialmente 14 das 18 cervejas produzidas por exclusão dos ensaios DL e DS das cervejas *Weiss* e *Dunkel* após a sua prova preliminar. Foram servidos cerca de 100 mL de cerveja a uma temperatura de 10°C, e numa ordem de degustação das cervejas (controlo e co-fermentadas) propositadamente aleatória, de modo a não influenciar o provador. Os provadores preencheram, para cada cerveja, uma ficha de prova construída para o efeito (Anexo IV), na qual era pedido, para além de uma análise sumária de parâmetros básicos de aparência, aroma, *flavour*, palato e *drinkability*, que atribuísem uma classificação geral, a sua intenção de compra e finalmente se consideravam que a cerveja em análise se adequava ao estilo proposto ou não.

3.6. Análise estatística

Os resultados de HPLC, °Brix, pH e GC foram submetidos a análise estatística de forma a averiguar a ocorrência de diferenças significativas entre as médias dos resultados. Foi utilizado o programa de análise estatística XLSTAT© (Addinsoft) para a condução análise de variância (ANOVA), recorrendo-se ao teste Tukey com um grau de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preâmbulo

Este subcapítulo irá introduzir e fundamentar os métodos seleccionados, bem como a adaptação que estes sofreram de modo possibilitar um melhor entendimento do impacto das leveduras não-convencionais na fermentação da cerveja, tanto do ponto de vista microbiológico como físico-químico.

4.1.1. Selecção dos estilos de cerveja

Os estilos de cerveja foram definidos inicialmente com base em critérios que abonariam em favor da levedura em detrimento do substrato, ou seja, os estilos seleccionados teriam que ser básicos, no sentido de popularidade e no sentido de incluírem pouca aromatização pela adição de lúpulo, ou pela utilização de uma mistura de maltes muito complexa. Pretendeu-se, portanto, utilizar receitas que conseguissem espelhar bem o estilo de cerveja, mas que, simultaneamente, não comprometem-se a actividade da levedura, no sentido de a remeter somente ao papel de produção de etanol e dióxido de carbono. De modo a abranger estilos de cerveja *Lager* e *Ale*, baixa e alta fermentação respectivamente, diferentes tonalidades e complexidade de mosto, foram definidos dois estilos de *Ale*: *Stout* (coloração castanha-escura) e *Weiss* (coloração amarela esbranquiçada) e um estilo de *Lager*: *Dunkel* (coloração âmbar). A composição química dos mostos produzidos encontra-se na Tabela 5. Estes estilos permitiriam que o *flavour* e aroma provenientes do malte e lúpulo não fosse demasiado proeminente, conseguindo a(s) levedura(s) responsável pela fermentação assumir o papel primário no desenvolvimento das características sensoriais da cerveja.

Tabela 5- Composição físico-química dos mostos *Stout*, *Weiss* e *Dunkel*.

	Glucose	Maltose	Maltotriose	Glicerol	°Brix	pH
Stout	10,44±0,47	51,64±2,21	15,77±0,81	0,80±0,00	15,38±0,11	5,10± 0,07
Weiss	14,15±2,83	60,17±1,63	16,58±2,73	0,22±0,01	14,20±0,57	5,47±0,10
Dunkel	17,28±0,78	41,11±1,83	13,18±0,90	0,28±0,08	15,30±0,00	5,15±0,05
Valores são médias das determinações duplicadas de cada mosto ± desvio-padrão.						

4.1.2. Selecção das estirpes de levedura e condições de fermentação

Os critérios de selecção das leveduras foram essencialmente baseados em estudos prévios, nos quais várias leveduras revelaram resultados positivos como agentes enaltecadores do perfil organoléptico de bebidas fermentadas. De entre várias espécies com capacidade fermentativa e produção de produtos metabólicos de interesse, foram seleccionadas quatro espécies de leveduras, pertencentes a géneros distintos: *Pichia kluyveri*¹, *Dekkera bruxellensis*, *Kloeckera apiculata* e *Torulaspora delbrueckii*.

¹No caso específico da estirpe de *Pichia kluyveri*, após os primeiros ensaios, foi detectada a capacidade de fermentação de maltose desta levedura contradizendo a caracterização desta espécie (Kurtzman et al., 2010), o que levou à sequenciação das regiões ITS da estirpe utilizando os primers ITS1 e ITS4, revelando posteriormente a identificação incorrecta na colecção do ISA, sendo uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* (Anexo V).

Dekkera bruxellensis é uma espécie de levedura cuja associação com cerveja é já conhecida e bem documentada, nomeadamente no seu papel na fermentação de cervejas *Sour* (Basso *et al.*, 2016). Neste estilo de cervejas, esta espécie de *Dekkera* é responsável pela produção de compostos aromáticos, tais como, acetato de etilo, caproato de etilo, caprilato de etilo e lactato de etilo, que contribuem significativamente para o carácter frutado e floral da cerveja (Vanderhaegen *et al.*, 2003). Porém, na maioria dos estilos de cerveja, a sua presença é considerada um defeito, sendo normalmente associada à produção de *off-flavours* (Crauwels *et al.*, 2015). Assim sendo, foi testada a hipótese de co-fermentação em estilos de cerveja normalmente pouco associados a esta espécie de levedura, de modo a avaliar a pertinência da sua utilização noutros estilos que não do tipo *Sour*. Foram seleccionadas duas estirpes desta espécie, isoladas a partir de cervejas *Lambic* e *Stout*.

Relativamente à estirpe de *Kloeckera apiculata*, a selecção desta baseou-se na conhecida contribuição de leveduras desta espécie no desenvolvimento sensorial do vinho (Sosa *et al.*, 2008; Ciani *et al.*, 2010). Apesar de serem leveduras *crabtree* negativas e apenas deterem capacidade de fermentação de glucose na ausência de oxigénio, a produção elevada de produtos metabólicos de interesse (Díaz-Montañó & Córdova, 2009; Escalante & Escalante, 2012) precipitaram a sua inclusão nos ensaios co-fermentativos.

A espécie *Pichia kluyveri* foi igualmente seleccionada como possível co-inóculo na fermentação de cerveja, essencialmente devido aos resultados positivos observados no estudo conduzido por (Sarens e Swiegers, 2014). Porém, como foi mencionado, a estirpe seleccionada não correspondia à identificação mencionada na colecção ISA, tendo sido os ensaios P co-fermentados com uma estirpe não-comercial de *Saccharomyces cerevisiae*, no lugar da estirpe de *P. kluyveri* como se pretendia.

Por último, a espécie *T. delbrueckii*, cuja performance em fermentações de vários substratos, nomeadamente mosto de cerveja e vinho (Renault *et al.*, 2009; Tataridis *et al.*, 2013), tem demonstrado resultados positivos em condições de co-fermentação com *Saccharomyces*, foi igualmente incluída no grupo de co-inóculos experimentais. Além da capacidade de assimilação de diversos mono-, di- e trissacáridos, a baixa produção de acetaldeído e acetoína (*off-flavours* na cerveja) e produção paralela de diversos ésteres, confirmaram a pertinência de utilização desta espécie de levedura na fermentação de cerveja (Loira *et al.*, 2014; Alves-Araújo *et al.*, 2007).

O método de fermentação aplicado: inoculação inicial com levedura não-convencional seguida de inoculação com estirpe comercial de *Saccharomyces*, ou seja co-inoculação sequencial, foi assim definido devido não só a características fermentativas específicas das estirpes não-convencionais mas também pelo comportamento que exibem na presença de leveduras do género *Saccharomyces*. A menor capacidade de assimilação e fermentação de açúcares das espécies seleccionadas (Kurtzman *et al.*, 2010; Alves-Araújo *et al.* 2007), nomeadamente a espécie de *K. apiculata* que não possui capacidade de assimilação de maltose, levaram a inclusão de inóculo comercial de modo a garantir a continuidade da fermentação e o esgotamento eficaz dos açúcares presentes no mosto. Em relação à escolha de inoculação sequencial em detrimento de inoculação simultânea, esta deve-se ao facto da presença de *Saccharomyces* afectar drasticamente a viabilidade e a concentração celular de leveduras

de outros géneros. Segundo (Wang *et al.*, 2014b; Lu *et al.*, 2015; Branco *et al.*, 2014; Albergaria *et al.*, 2010) o crescimento de estirpes de *K. apiculata*, *T. delbrueckii* e *D. bruxellensis* é afectado pela presença de *S. cerevisiae*, devido à libertação de péptidos antimicrobianos por parte desta levedura. A susceptibilidade destas leveduras aos péptidos resulta na perda significativa de viabilidade, e nalguns casos na diminuição da população das estirpes não-*Saccharomyces* a concentrações de inoculação (1×10^6 cel.mL⁻¹) ou inferiores. Assim, tendo em conta a supremacia que as leveduras de *Saccharomyces* exercem no substrato, foi definido que a inoculação das estirpes comerciais seria posterior às demais leveduras não-convencionais de modo a assegurar a influência destas no processo fermentativo.

A temperatura a que decorreram os ensaios fermentativos foi definida tendo em conta a temperatura óptima de crescimento das estirpes seleccionadas, entre 25-30°C (Kurtzman *et al.*, 2010). Os ensaios do estilo *Stout* e *Weiss* decorreram a uma temperatura de 25°C, dentro do intervalo óptimo das leveduras não-convencionais, sem, no entanto, condicionar em demasia a actividade das leveduras comerciais S-04 e BB (18-24°C) (Tabela 4). No caso do estilo *Dunkel*, a estirpe LB apresenta uma temperatura óptima de actividade dentro do intervalo de 8-12°C (Tabela 4), sendo definido o limite superior como temperatura de fermentação de modo a não limitar a actividade da levedura comercial, e, simultaneamente, testar o efeito da menor temperatura nas leveduras não-convencionais.

4.1.3. Meio selectivo

A conformidade das leveduras pode ser algo subjectivo, sendo frequente células da mesma estirpe assumirem diversas morfologias microscópicas que poderão ser confundidas com as de outros géneros/espécies. Na Figura 15 observa-se as distintas aparências microscópicas que as leveduras assumiram nos ensaios fermentativos. Verifica-se que, a morfologia bastante característica (alongada) de *Dekkera bruxellensis* é facilmente distinguível da estirpe comercial de *Saccharomyces* (Figura 15A), porém, a aparência microscópica da estirpe DS (Figura 15B) assumiu frequentemente uma conformidade menos alongada, mais oval e portanto semelhante a *S. cerevisiae*, dificultando por vezes a sua identificação. Na co-cultura de *K. apiculata* e *S. pastorianus* (Figura 15C), observa-se que a diferença na morfologia e tamanho celular é bastante significativa entre as duas leveduras. A Figura 15D apresenta uma amostra da co-cultura contendo duas estirpes de *S. cerevisiae*, comercial e selvagem, sendo notória a fraca ou até nula distinção entre a aparência de ambas estirpes. Por fim, verifica-se a distinção, ainda que ténue, entre a morfologia da estirpe de *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae*: células mais arredondadas e de menor diâmetro pertencem à estirpe de *T. delbrueckii* (Figura 15E).

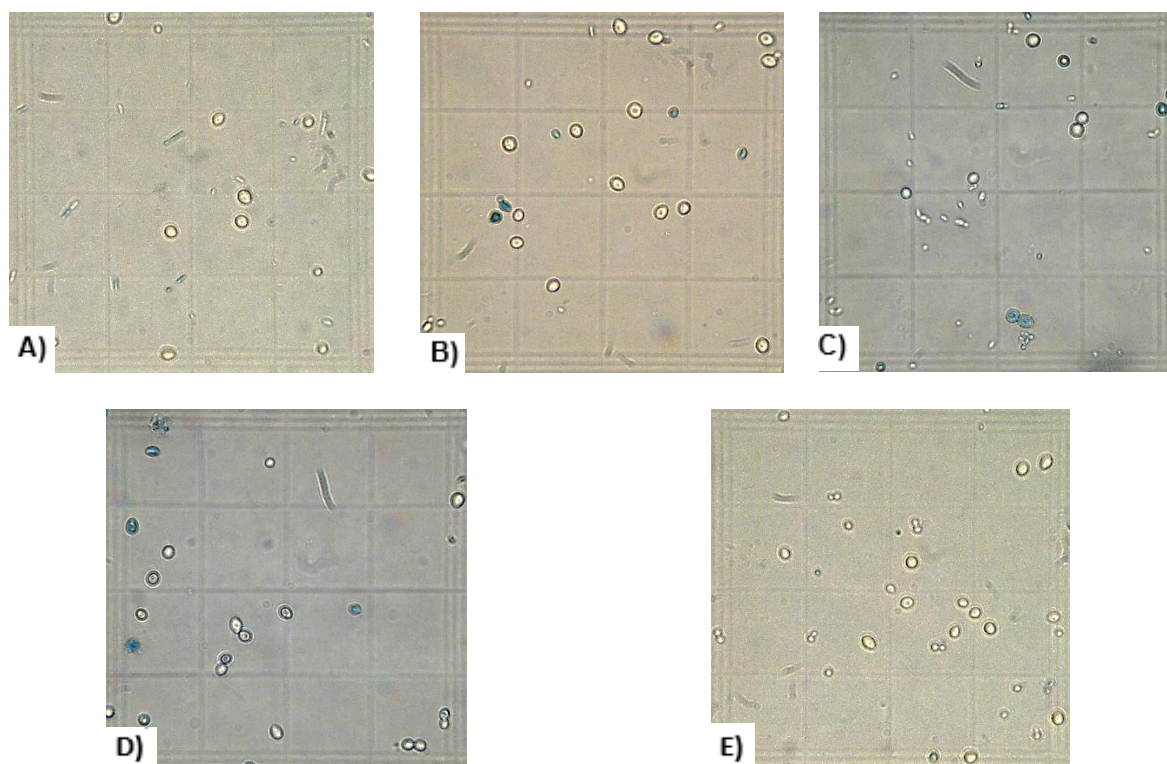


Figura 15 - Aparência microscópica das co-culturas. A) Co-cultura de *S. cerevisiae* S-04 e *D. bruxellensis* DL; B) Co-cultura *S. cerevisiae* S-04 e *D. bruxellensis* DS; C) Co-cultura *S. pastorianus* LB e *K. apiculata*; D) Co-cultura *S. cerevisiae* S-04 e *S. cerevisiae* não-comercial P; E) Co-cultura *S. cerevisiae* BB e *T. delbrueckii*.

Devido a estas limitações na identificação das leveduras, foi ponderado a possibilidade de utilizar/formular um meio selectivo que conseguisse contornar este problema. O meio selectivo foi formulado através da adição de cicloheximida a meio YPD. Apesar da cicloheximida ser essencialmente utilizada para a inibição de leveduras e bolores e portanto sendo adicionada para criar meios selectivos para observação de bactérias, através da maior ou menor resistência das leveduras a este antibiótico foi possível formular um meio selectivo para leveduras não-convencionais exclusivamente com a adição de cicloheximida numa concentração específica em meio YPD. A partir dos resultados obtidos por (Morneau *et al.*, 2011) (Tabela 6), concluiu-se que a concentração de 10 mg.L⁻¹ seria ideal para criar o meio selectivo adaptado às leveduras em estudo, uma vez que inibe o crescimento de espécies de *Saccharomyces*, permitindo simultaneamente o crescimento de espécies do género *Hanseniaspora* (telemorfo de *Kloeckera*), *Dekkera* e *Torulaspora*.

Inoculou-se em meio selectivo (YPD + cicloheximida 10 mg.L⁻¹) uma ansada de biomassa das leveduras de controlo (S-04, BB e LB) e de ensaio (DL, DS, K, P e T), incubando as placas em estufa a 28°C durante uma semana. Após esse período, observou-se crescimento para as estirpes de *Dekkera*, *Saccharomyces* (não-comercial - P) e *Kloeckera*, não se registando qualquer crescimento para as leveduras do género *Saccharomyces* (comerciais) ou *Torulaspora*. Segundo (Kurtzman *et al.*, 2010), a espécie *T. delbrueckii* não exibe crescimento a 0,01 % (m/v) cicloheximida, verificando-se que a resistência a cicloheximida é dependente da estirpe nesta espécie de levedura.

Tabela 6- Resistência de diversas estirpes de levedura ao antibiótico cicloheximida. Crescimento de várias leveduras em meio WL contendo 0 (WL0), 10 (WL10), 50 (WL50) ou 100 (WL100) mg.L⁻¹ de cicloheximida. Fonte: (Morneau, Zuehlke, and Edwards 2011)

Micro-organism	Medium									
	WL ₀		WL ₁₀		WL ₅₀		WL ₁₀₀		DBDM	
	7 days	14 days	7 days	14 days	7 days	14 days	7 days	14 days	7 days	14 days
<i>Candida parugosa</i> Q2	+	+	w	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida stellata</i> ATCC 10673	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dekkera bruxellensis</i> B1b	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i> ATCC 204301	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Issatchenkia orientalis</i> ATCC 204290	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> ATCC 18406	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia guillermoidii</i> Q3	+	+	+	+	+	+	+	+	w	w
<i>Pichia membranefaciens</i> ATCC 10653	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC1118	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UCD 522	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> ATCC 16979	+	+	+	+	+	+	-	w	-	-
<i>Torulaspora delbrueckii</i> CBS 9047	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> ATCC 8766	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> B2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> B6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i> ATCC 38993	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i> ATCC 26812	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> ATCC 10687	+	+	w	+	-	-	-	-	-	-

(+) growth; (w) weak growth; (-) no growth

Assim, em termos microbiológicos, assumem-se estas duas contingências: ausência de resultados de plaqueamento selectivo dos ensaios co-inoculados com *T. delbrueckii* (ensaios T); e ausência de resultados de hemocítmetro discriminados por estirpe nos ensaios co-inoculados com estirpe *S. cerevisiae* selvagem (ensaios P).

4.1.4. Análise de compostos por HPLC

Os compostos de interesse definidos para quantificação no HPLC foram aqueles cuja influência na cerveja é mais determinante. A observação do padrão de consumo de açúcares e produção de produtos metabólicos secundários (ácidos orgânicos e polióis) e principais (etanol) são critérios essenciais para a caracterização não só da cerveja como produto final mas igualmente do metabolismo das leveduras não-convencionais.

A concentração máxima de detecção estabelecida para a realização das curvas de calibração decorreu de uma extrapolação por defeito de concentrações gerais conhecidas dos compostos mencionados (Coote & Kirsop, 1974) (Nykänen & H. Suomalainen, 1983) de modo a albergar variações que possam decorrer nos vários ensaios sem penalização, ou seja, sem a detecção de concentrações superiores àquela definida como máxima.

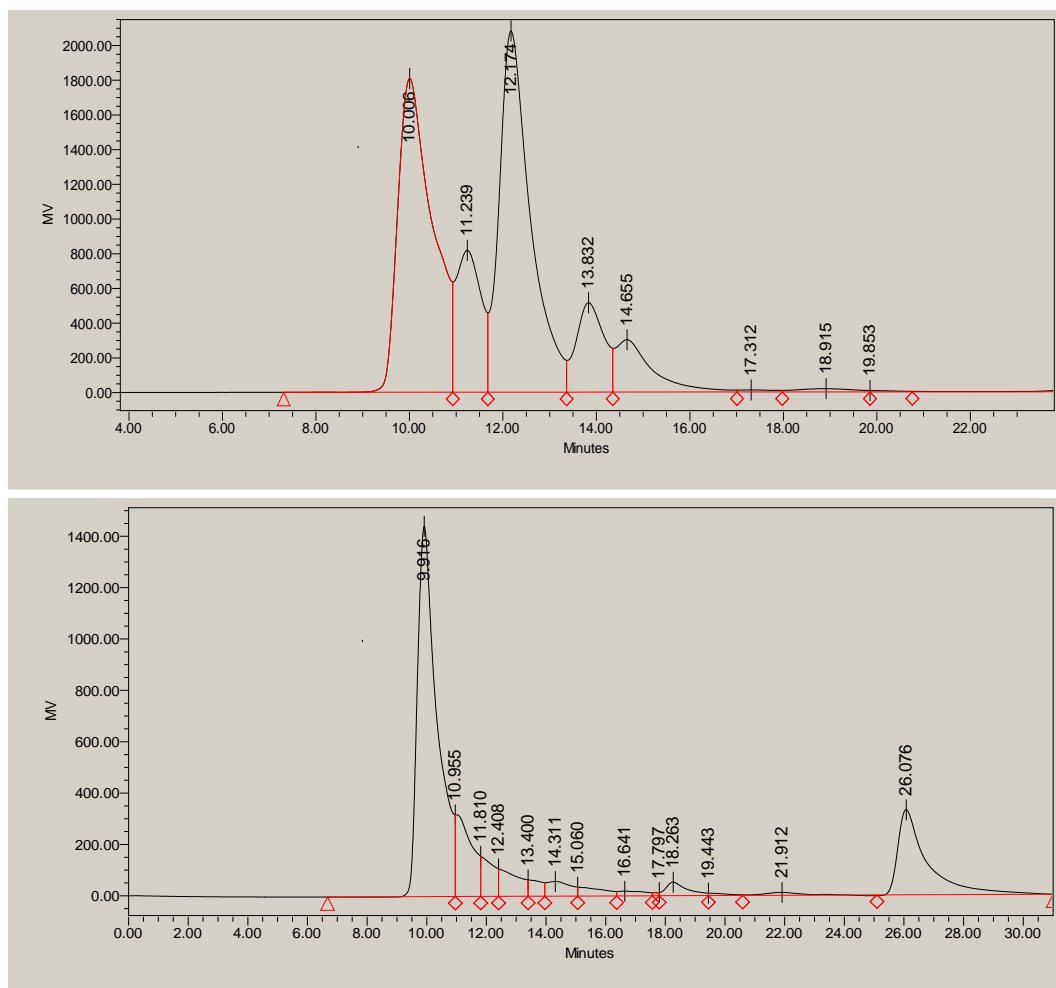


Figura 16 – Evolução do perfil físico-químico da cerveja durante a fermentação. Cromatogramas de amostras de mosto não inoculado (cima) e mosto fermentado (baixo). Ensaio K, estilo *Dunkel* às 0h e 320h de fermentação, respectivamente.

Através da observação dos cromatogramas da Figura 16, que reflectem a evolução do perfil físico-químico da cerveja ao longo da fermentação, é evidente a complexidade da matriz da cerveja. Verifica-se, além do elevado número de compostos detectados, que a proximidade dos tempos de retenção entre estes dificulta a identificação e quantificação dos mesmos. Devido ao tempo de retenção demasiado próximo entre os compostos, (Anexo VI) a interferência no tamanho e subsequentemente quantificação da área dos picos é evidente, ocorrendo mesmo a aglutinação total de picos com áreas

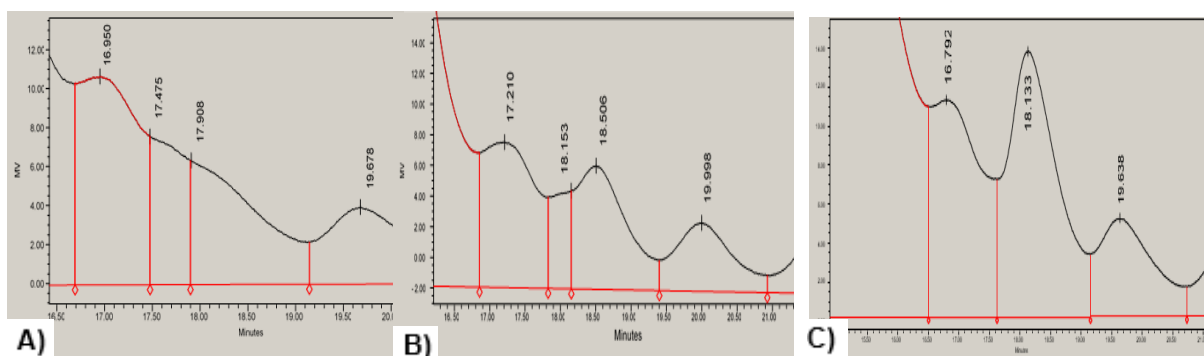


Figura 17 – Cromatogramas ampliados na região de detecção de glicerol. A), B) e C): ensaio K estilo *Dunkel* às 0h, 24h e 48h, respectivamente. Observa-se nas imagens dos cromatogramas, da esquerda para a direita, picos de ácido succínico, ácido láctico, glicerol e ácido acético.

menores por outros de maior dimensão. Por exemplo, na Figura 17 observa-se que a evolução do glicerol claramente influencia a quantificação dos ácidos orgânicos succínico e acético, e, a partir de certa concentração, impede a visualização do pico do ácido láctico (17C).

A identificação e quantificação dos ácidos orgânicos málico e cítrico foram de igual forma influenciadas por outros compostos de interesse com tempos de retenção semelhantes.

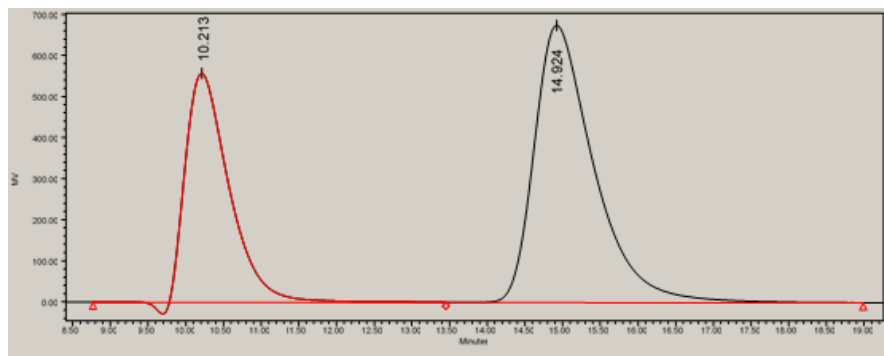


Figura 18- Cromatograma solução aquosa ácido málico [10 mg.mL⁻¹] + fructose [10 mg.mL⁻¹].

No caso do ácido málico, observa-se na Figura 18 que os tempos de retenção muito semelhantes entre a frutose e este ácido resultam no aparecimento de apenas um só pico aos 14,92 minutos, assumindo o

pico visível aos 10,21 minutos como padrão interno. Assim, a frutose impede totalmente a visualização do pico deste ácido orgânico, apenas visível em cromatogramas de momentos mais tardios na fermentação, após consumo deste açúcar. Em relação ao ácido cítrico, a identificação é mais problemática, uma vez que o seu tempo de retenção encontra-se entre a maltose e glucose (Figura 19), principais açúcares do mosto de cerveja. Devido à concentração elevada destes açúcares, o pico deste ácido somente é visível em ensaios cujo consumo de maltose e glucose seja quase absoluto, exercendo estes, mesmo em concentrações residuais, influência sobre identificação e quantificação do ácido cítrico.

Apesar de todas estas limitações e sabendo que as concentrações observadas, essencialmente nos ácidos orgânicos, se encontravam inflacionadas, tentou-se construir uma técnica que salvaguardasse a veracidade da identificação dos compostos de interesse e até certo ponto a veracidade das

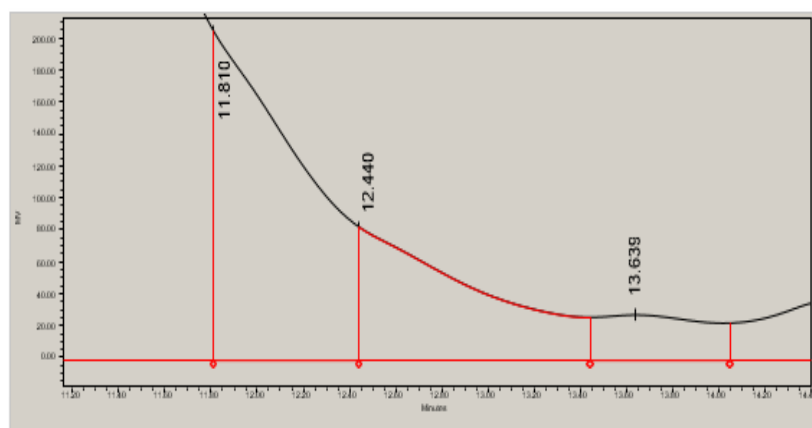


Figura 19- Cromatograma ampliado na região de detecção de ácido cítrico. Ensaio controlo do estilo Stout às 170h de fermentação. Observa-se, da esquerda para a direita picos correspondentes a maltose, ácido cítrico e glucose.

concentrações aferidas. Foi empregue um método para a confirmação da fiabilidade dos resultados obtidos baseado exclusivamente no tempo de retenção. Testou-se a hipótese de relacionar os tempos de retenção dos compostos e o tempo de retenção do padrão interno (tempo de retenção aos 10 minutos – Figuras 16 e 18) observados nas amostras de cerveja, verificando se as

médias desta relação diferiam significativamente das observadas nas soluções padrão utilizadas para as curvas de calibração. Tendo em conta que nas amostras injectadas para a realização das curvas de calibração não existe influência da presença de outros compostos, calculou-se a diferença e a razão entre os valores de tempo de retenção de cada composto e o valor de tempo de retenção do padrão interno em cada amostra, assumindo os resultados das curvas de calibração como padrão. Este método foi aplicado a todos os ensaios realizados, encontrando-se os resultados finais no Anexo VI. Em cada ensaio, as médias das variáveis quantitativas “rácio” e “diferença” foram avaliadas em relação à variável qualitativa “tempo” na procura de diferenças significativas (teste Tukey, $p < 0,05$) entre os picos obtidos nas amostras analisadas e correspondente curva de calibração.

Os resultados permitiram verificar que as médias de rácio e diferença são bastante semelhantes entre as amostras de fermentação e que a maioria não difere significativamente das médias das curvas de calibração. Analisando mais pormenorizadamente os resultados, consegue-se observar um padrão relacionado com a concentração dos compostos ao longo da fermentação: a concentração elevada de um certo composto reflecte-se no cromatograma por uma área de pico superior e consequentemente num tempo de retenção com o mínimo de desvio em relação à curva de calibração. À medida que o composto é consumido, o pico torna-se menos definido e o tempo de retenção observado sofre um desvio, passando a diferir dos tempos de retenção observados nas RC dos mesmos compostos. Por exemplo, no caso da maltose, em amostras recolhidas nos primeiros momentos de fermentação, em que a sua concentração é elevada, apresentou um pico bem definido no cromatograma, sendo o seu tempo de retenção praticamente idêntico à RC, porém, em amostras que a sua concentração é residual (final da fermentação) a banda observada alargou, observando-se um desvio no tempo de retenção. O cenário inverso verificou-se para a maioria dos ácidos orgânicos, glicerol e etanol uma vez que a sua concentração aumenta com o desenrolar do ensaio fermentativo.

Tendo em conta estas limitações, e sob o risco de introdução de resultados erróneos, não serão apresentados os resultados do ácido láctico e ácido cítrico por falta de fiabilidade e, nalguns ensaios, ausência de dados. Para os restantes ácidos orgânicos, a concentração encontra-se inflacionada não devendo assumir-se como real, sendo, no entanto, utilizada para efeitos comparativos entre ensaios dentro do mesmo estilo de cerveja.

4.1.5. Análise do perfil aromático por Cromatografia Gasosa

As provas preliminares das cervejas conduzidas após a sua produção permitiram verificar que a principal distinção entre as cervejas residia no perfil aromático das mesmas. Tendo em conta este resultado, procurou-se analisar as amostras quanto ao seu perfil aromático, recorrendo-se à cromatografia gasosa. Para tal, foi necessário, numa primeira instância, definir os compostos aromáticos expectáveis nos diferentes tipos de cerveja produzidos e tendo em conta a disponibilidade destes dentro do ISA, efectuar as curvas de calibração para a sua identificação e quantificação.

Após pesquisa bibliográfica, foram definidos 22 compostos de maior relevo na cerveja entre aldeídos, ésteres, álcoois superiores e compostos fenólicos, tendo sido apenas realizadas curvas de calibração para nove (Anexo III).

O protocolo estabelecido para a análise do perfil aromático com recurso a cromatografia gasosa foi construído com base no trabalho desenvolvido por (Saison *et al.*, 2008) em que se demonstra que a melhor extracção líquida possível foi conseguida com recurso ao solvente diclorometano e com adição de NaCl numa concentração de saturação, ou seja $0,35 \text{ mg.mL}^{-1}$. As extracções líquidas da componente aromática das amostras de cerveja foram realizadas em duplicado de modo a possibilitar a adição de soluções padrão dos compostos de interesse numa das réplicas. Através da justaposição dos cromatogramas, com e sem adição de soluções padrão, a leitura e identificação dos compostos análise da matriz aromática da cerveja tornou-se simultaneamente mais simples e mais fiável.

Contudo, os cromatogramas resultantes das corridas das amostras revelaram que tanto a proximidade dos tempos de retenção de compostos (Anexo III) como a concentração abaixo do limiar de detecção de certos compostos nas amostras impediram a quantificação da maioria dos compostos de interesse, apresentando assim os resultados de apenas 4 dos 9 compostos de interesse.

4.2. Estilo *Stout*

4.2.1. Evolução dos ensaios fermentativos

4.2.1.1. Evolução da microbiota

Os ensaios conduzidos no mosto de estilo *Stout*, tendo em conta os resultados obtidos para a variação do número de células totais ao longo da fermentação (Figura 20A), assumem padrões de crescimento quase idênticos entre si, com fase de crescimento exponencial e estacionária bem definidas. A representação dos resultados dos ensaios individuais encontra-se no anexo VII.

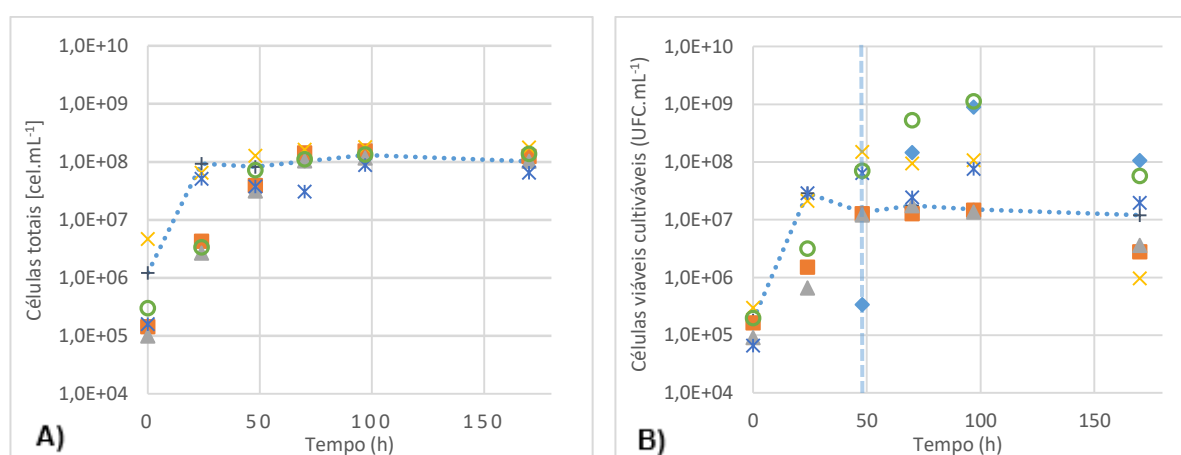


Figura 20- Curvas de crescimento das leveduras durante fermentações co-inoculadas e de controlo (mosto *Stout*). A- Evolução da concentração de células totais. B – Evolução da concentração de células viáveis cultiváveis. Os valores apresentados no gráfico B da estirpe S-04 (co-inóculo) resultam da média de valores observados em cada ensaio co-fermentado. Os valores do ensaio T no gráfico B correspondem a células viáveis totais, ou seja, estirpe T + S-04. Linha vertical tracejada simboliza momento da inoculação da estirpe comercial S-04 nos ensaios co-fermentados.

Símbolos: (-+-) Controlo; (♦) Co-inóculo S-04; (■) DL; (▲) DS; (×) K; (×) P; (○) T.

Observa-se que o ensaio de controlo e P atingem a fase estacionária após 24 horas, apresentando estes ensaios taxas específicas de crescimento elevadas: 0,180 h⁻¹ e 0,240 h⁻¹, respectivamente. Destaca-se igualmente a celeridade do ensaio K, que entra em fase estacionária ao fim de 48 horas, sendo, porém, de realçar que partiu de uma concentração de inóculo inicial superior (4,68x10⁶ cel.mL⁻¹). Os ensaios DL, DS e T assumem uma curva de crescimento praticamente indistinguível entre si, atingindo a fase estacionária somente às 72 horas, tendo uma menor taxa específica de crescimento: 0,117 h⁻¹, 0,120 h⁻¹, 0,114 h⁻¹, respectivamente. A partir das curvas obtidas é possível também verificar que, apesar das diferenças na concentração de inóculo inicial, a concentração de células totais final é praticamente idêntica em todos os ensaios e da ordem de grandeza de 1,0x10⁸ cel.mL⁻¹.

Relativamente à Figura 20B, que corresponde às células viáveis com capacidade de multiplicação, observa-se que às 48 horas de fermentação, no momento de co-inoculação da estirpe comercial, os

ensaios podem-se dividir em dois grupos, de acordo com a concentração celular: 1º) ensaios K, P e T com concentração na ordem de grandeza de $1,0 \times 10^8$ cel.mL⁻¹; e 2º) ensaios inoculados com estirpes de *D. bruxellensis* (DL e DS), que revelam um comportamento similar, ambas apresentando um valor de células viáveis cultiváveis de $1,20 \times 10^7$ cel.mL⁻¹. Observa-se que, a estirpe comercial S-04 co-inoculada nos ensaios mistos, atinge um valor de $1,47 \times 10^8$ cel.mL⁻¹ ao fim de 24 horas, tornando-se na levedura predominante, ultrapassando, em termos populacionais, as estirpes não-convencionais já presentes no mosto. Além da supremacia evidente que exerce na co-cultura, é clara a influência da co-inoculação da estirpe comercial na capacidade de multiplicação das estirpes não-convencionais, sendo que, o número de células viáveis cultiváveis destas decresce ou estabiliza após a inoculação da estirpe comercial S-04.

Comparando o comportamento das leveduras não-convencionais, destaca-se, em primeiro lugar, um padrão similar ao identificado por (Barrajón *et al.*, 2011): a levedura não-comercial *S.cerevisiae* (ensaio P) é a menos afectada pela presença da levedura domesticada. Uma hipótese que se pode colocar é que a interacção entre estirpes distintas de *S.cerevisiae* seja essencialmente sinérgica, actuando a nível de modificação e partilha de produtos metabólicos (e.g. compostos produzidos por uma estirpe podem ser assimilados e convertidos por outra) (Cheraiti *et al.*, 2005). Os dados do ensaio co-inoculado com a estirpe de *K. apiculata*, por outro lado, revelam que esta levedura foi a mais afectada pela presença da estirpe S-04, atingindo o menor de valor final de células viáveis cultiváveis: $9,70 \times 10^5$ cel.mL⁻¹. Observa-se que esta ocorrência, já evidenciada no estudo conduzido por (Wang *et al.*, 2014b), não está relacionada com a concentração de células no momento da co-inoculação da estirpe comercial, tendo em conta o valor mais elevado de *K. apiculata* nesse momento ($1,50 \times 10^8$ cel.mL⁻¹). Em relação às estirpes de *D. bruxellensis*, o comportamento após co-inoculação com a estirpe S-04 é semelhante entre si, começando a decrescer o número de células 48 horas após a co-inoculação. A evolução dos valores no ensaio T para *T. delbrueckii* e S-04, embora não tenha sido possível distinguir as duas estirpes, indicam que a concentração de células da estirpe de *T. delbrueckii* terá diminuído 24 horas após co-inoculação, uma vez que os valores registados da cultura total se aproximam dos valores obtidos para a estirpe de S-04, o que reflecte a perda de representatividade da co-cultura de *T. delbrueckii* na concentração total de células do ensaio, tal como foi observado por (Loira *et al.*, 2014). Atendendo agora à viabilidade total das culturas co-inoculadas expressa em número de células metabolicamente activas capazes de reduzir o azul de metileno (Figura 21A), esta revela um padrão semelhante ao observado nos resultados de células viáveis cultiváveis: crescimento acentuado da estirpe comercial, que, após 48 horas, se assume como levedura predominante no substrato e, paralelamente, decréscimo suave do número de células viáveis totais nas populações das leveduras não-convencionais.

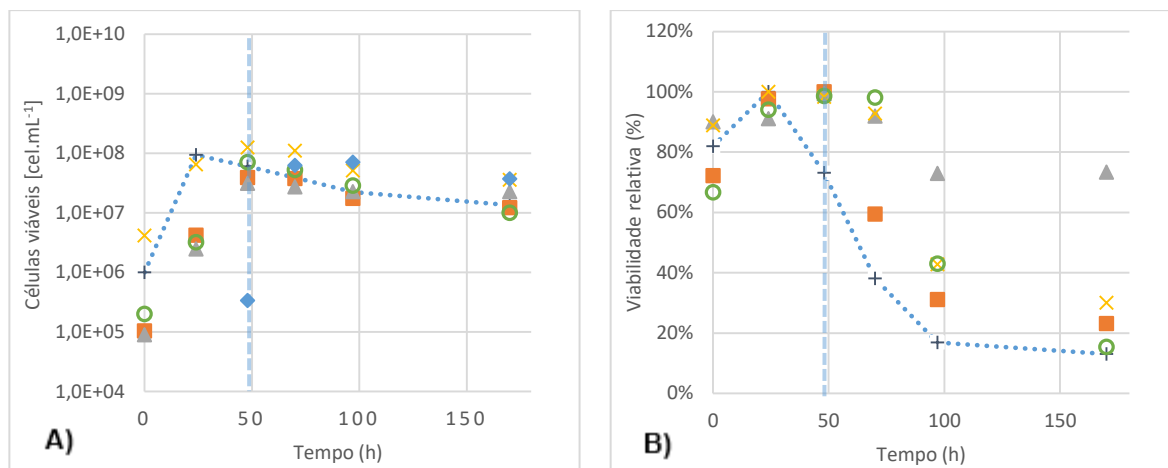


Figura 21- Evolução da viabilidade dos ensaios fermentativos em mosto *Stout*. A) Evolução da concentração de células viáveis (Os valores apresentados no gráfico da estirpe S-04 (co-inóculo) resultam da média de valores observados em cada ensaio co-fermentado.); B) Evolução da viabilidade relativa ($vr = \text{cel.viáveis} / \text{cel.totais}$). Linha vertical tracejada simboliza momento da inoculação da estirpe comercial S-04 nos ensaios co-fermentados. **Símbolos:** (-+-) Controlo; (◆) Co-inóculo S-04; (■) DL; (▲) DS; (×) K; (✱) P; (○) T.

Pode-se afirmar que a interacção da estirpe comercial afecta claramente a viabilidade (em termos de capacidade reprodutiva) das restantes estirpes não-comerciais, sem, no entanto, comprometer totalmente a sua vitalidade em termos metabólicos. Verifica-se que o decréscimo acentuado da capacidade reprodutiva das estirpes não-convencionais não é acompanhado pela perda total de capacidade metabólica das mesmas, uma vez que após a inoculação da estirpe comercial, o número de células viáveis sofre um decréscimo pouco significativo. Assim, apesar da perda de capacidade reprodutiva, uma fracção da população viável total dos ensaios co-fermentativos ainda mantém alguma capacidade metabólica. Por exemplo, comparando dados das Figuras 20B e 21A, observa-se que, para o último momento do ensaio DL, o valor de células viáveis cultiváveis desta estirpe é de $2,78 \times 10^6$ cel.mL⁻¹, continuando, porém, a apresentar uma elevada concentração de células com capacidade metabólica ($1,22 \times 10^7$ cel.mL⁻¹). Ainda se observa que a evolução do número de células viáveis das estirpes não-comerciais é muito semelhante à evolução do ensaio de controlo.

O gráfico da Figura 21A somente revela a viabilidade em termos numéricos absolutos, não incluindo o número de células não-viáveis (coradas de azul) observadas nos ensaios, sendo que a relação entre estes dois dados poderá elucidar com maior profundidade o impacto e comportamento sinérgico entre as estirpes. Assim, a Figura 21B compara a viabilidade relativa das estirpes de levedura não-convencionais antes e depois do momento de inoculação da estirpe comercial. Até às 48 horas de fermentação, observa-se um aumento da fracção de células viáveis dentro das células totais em todos os ensaios, atingindo viabilidade total no momento de co-inoculação. Após a inoculação da estirpe S-04, verifica-se, em primeiro lugar, que a estirpe DS é a menos afectada pela presença desta estirpe de *S. cerevisiae*, finalizando o ensaio com viabilidade relativa de 73%. No caso da estirpe DL, o comportamento é distinto, observando-se que a presença da S-04 provocou um decréscimo mais célere e absoluto na fracção de células viáveis, representando estas somente 23% da concentração total. A estirpe de *T. delbrueckii* revela um comportamento ao observado no ensaio DL, finalizando a

fermentação com apenas 15% de viabilidade, evidenciado a quebra na viabilidade mais drástica do grupo. A viabilidade relativa da estirpe de *K. apiculata* é igualmente influenciada pela presença da estirpe comercial, apresentando um decréscimo veloz de viabilidade após o momento da co-inoculação, atingindo valor final de 30%.

Tabela 7- Viabilidade relativa inicial e final dos ensaios co-fermentativos.

Ensaio	DL			DS			K			P			T		
Levedura	DL	S-04	Total	DS	S-04	Total	K	S-04	Total	P	S-04	Total	T	S-04	Total
Inicial	72%	100%	-	90%	100%	-	89%	100%	-	100%	100%	-	67%	100%	-
Final	23%	71%	51%	73%	41%	50%	30%	46%	35%	-	-	73%	15%	54%	36%

Os resultados até agora discutidos podem ainda ser afectados pela viabilidade inicial dos inóculos, devendo ponderar este factor nas conclusões da evolução microbiota dos ensaios. Assim encontra-se na Tabela 7 a viabilidade inicial e final dos ensaios discriminada por estirpe. Apesar da distinção observável entre a viabilidade inicial dos inóculos, esta não se relaciona com a viabilidade final do ensaio. O ensaio P inoculado inicialmente com estirpe de *S. cerevisiae* não-comercial, apresenta uma viabilidade final total bastante superior às demais, padrão que suporta a possibilidade enunciada anteriormente, em que a interacção entre estirpes de *S. cerevisiae* será menos concorrencial. Confirma-se nos restantes ensaios que, à excepção do ensaio DS, a viabilidade final da estirpe comercial é superior à levedura não-convencional, sendo que a cultura viável presente na cerveja não-maturada é maioritariamente composta pela estirpe S-04.

À luz destes resultados, observa-se que a influência da actividade da levedura comercial nas co-culturas é essencialmente notória na concentração de células viáveis cultiváveis e na viabilidade relativa, sem, no entanto, comprometer totalmente a actividade metabólica das estirpes não-convencionais. Consequentemente, pode-se afirmar que a contribuição das estirpes não-convencionais para o ensaio fermentativo, apesar de ser mais preponderante nas primeiras 48 horas, é contínua ao longo da fermentação.

4.2.1.2. Evolução físico-química

Em relação aos resultados obtidos para o perfil de consumo de açúcares e produção de etanol e glicerol (Figura 22), observa-se, de forma transversal a todos os ensaios, um consumo sequencial de açúcares, com a glucose e a maltose a serem consumidas primeiro, porém, devido à ausência de pontos nas primeiras 48 horas, o consumo sequencial é mais evidente no consumo de maltotriose, sendo somente assimilada após o esgotamento de maltose e glucose.

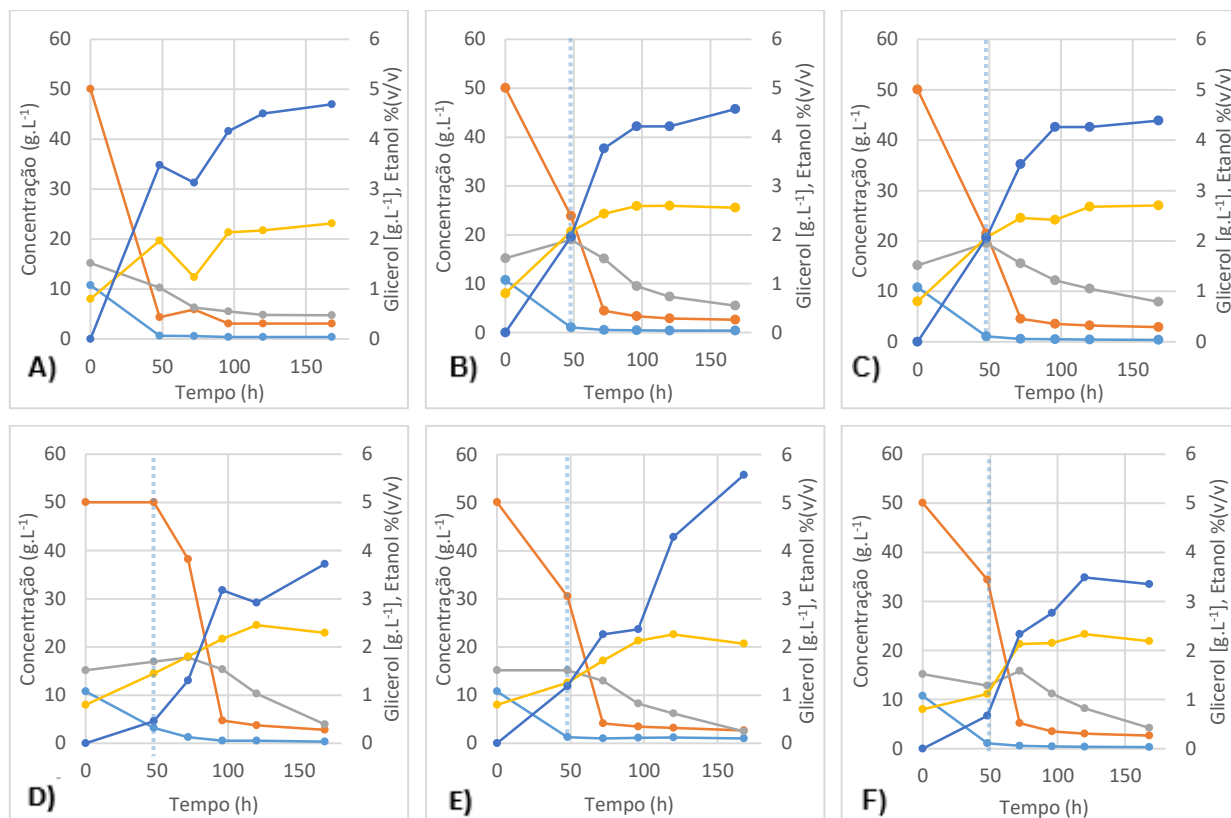


Figura 22- Consumo de açúcares e produção de glicerol e etanol nos ensaios de mosto *Stout*. A) Ensaio de controlo; B) Ensaio co-fermentado com *D. bruxellensis* DL; C) Ensaio co-fermentado com *D. bruxellensis* DS; D) Ensaio co-fermentado com *K. apiculata*; E) Ensaio co-fermentado com *S. cerevisiae* P; F) Ensaio co-fermentado com *T. delbrueckii*. Linha vertical tracejada simboliza momento da inoculação da estirpe comercial S-04 nos ensaios co-fermentados. Legenda: —●— GLUCOSE —●— MALTSE —●— MALTOTRIOSE —●— GLICEROL —●— ETANOL

A estirpe comercial de controlo (S-04) revela um metabolismo mais acelerado que as estirpes não-convencionais (figura 22A), atingindo concentrações residuais dos principais açúcares (maltose e glucose) ao fim de apenas 48 horas a um ritmo de consumo de açúcares de $1,26 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Os ensaios co-inoculados com estirpes de *D. bruxellensis*, DL e DS (Figuras 22B e 22C), assumem um padrão de consumo de açúcares e rendimento em etanol semelhantes ao controlo: $0,54$, $0,53$ e $0,55 \text{ g.g}^{-1}$ (gramas de etanol produzido por grama de açúcar consumido), respectivamente. Contudo, limitando a análise às primeiras 48 horas de fermentação, nas quais a presença das estirpes *D. bruxellensis* é exclusiva no mosto, observa-se que estas apresentam um rendimento superior em etanol quando comparadas com o controlo (DL- $0,48$; DS- $0,48$ e controlo- $0,45 \text{ g.g}^{-1}$), o que está de acordo com os resultados apresentados por (Blomqvist *et al.* 2010). Para além disso, observa-se que os ensaios DL e DS, com concentrações inferiores de células viáveis (Figura 21A), obtiveram um maior rendimento em etanol que os ensaios co-inoculados com *K. apiculata* ($0,42 \text{ g.g}^{-1}$) e *T. delbrueckii* ($0,38 \text{ g.g}^{-1}$). Entre as duas estirpes de *Dekkera bruxellensis*, os ensaios revelam pouca distinção, com excepção da velocidade de consumo de maltose ligeiramente superior da estirpe DS ($0,60 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em detrimento da estirpe DL ($0,55 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), podendo ser justificada pela variabilidade genética ou pela maior fracção de células metabolicamente activas do ensaio DS (Figura 21B). O ensaio co-inoculado com a estirpe de *K. apiculata* distingue-se por esta espécie consumir exclusivamente glucose (Kurtzman *et al.*, 2010), levando a que a maltose apenas seja assimilada após inoculação da estirpe comercial S-04. Neste

ensaio, o rendimento em etanol ($0,42 \text{ g.g}^{-1}$) encontra-se em concordância com os estudos (Díaz-Montañó *et al.*, 2008; Zohre & Erten, 2002) nos quais foram detectadas apenas ligeiras diferenças neste parâmetro fermentativo entre ensaios co-inoculados (*K. apiculata* + *S. cerevisiae*) e de controlo (*S. cerevisiae*). O esgotamento veloz de glucose (72 horas) neste ensaio e portanto ausência de fonte de carbono poderá ter precipitado o rápido decréscimo de viabilidade relativa e capacidade de reprodução da estirpe K observado nas Figuras 20B e 21B, aumentando o número de células em apoptose, tal como já foi observado no caso da fermentação vinária (C.Prista, comunicação pessoal).

Tendo em conta as primeiras 48 horas de fermentação, a estirpe de *S. cerevisiae* não-convencional (P) revelou uma velocidade de consumo de açúcares inferior à comercial (S-04), bem como um menor rendimento em etanol ($0,56 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,35 \text{ g.g}^{-1}$, respectivamente). No entanto, a sinergia entre as duas estirpes co-inoculadas é evidente, resultando num acréscimo substancial no rendimento de etanol ($0,76 \text{ g.g}^{-1}$), com concentração final maior do grupo: aprox. 6% (v/v). Por último, o ensaio T espelha um cenário expectável, tendo em conta a baixa produção de glicerol e menor rendimento em etanol característico da espécie *T. delbrueckii*, já evidenciada em co-fermentações com *S. cerevisiae* (Canonico *et al.* 2016). Todavia o ensaio decorreu de forma semelhante aos demais, exibindo a estirpe *T. delbrueckii*, até o momento de co-inoculação, uma razoável velocidade de consumo de açúcares ($0,58 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) tendo em conta a menor viabilidade do inóculo (67%).

4.2.2. Produto final

4.2.2.1. Perfil físico-químico

Em relação à análise do produto final, os resultados presentes na Tabela 8 reflectem o perfil físico-químico das cervejas pós-maturação. Numa primeira abordagem geral, verifica-se que, somente o volume de etanol difere significativamente entre os ensaios, mais especificamente, entre o ensaio P e os demais ensaios, com excepção do ensaio DL. Porém, é pertinente discutir as diferenças nos valores absolutos, cujo padrão poderá elucidar características específicas das estirpes de leveduras utilizadas. Em primeiro lugar, relativamente à utilização dos açúcares, observa-se que o ensaio de controlo e o ensaio P foram aqueles em que a atenuação de açúcares foi mais completa (94% e 95%, respectivamente) atingindo um valor de concentração de açúcares residuais menor, reflectido igualmente no valor de °brix. O ensaio co-inoculado com estirpe de *K. apiculata* foi aquele cuja fermentação terminou com maior concentração de açúcares residuais no mosto ($9,47 \text{ g.L}^{-1}$), contudo, sem que isso se tenha traduzido em diferenças significativas nas concentrações de etanol (4,27 %) e glicerol ($1,27 \text{ g.L}^{-1}$), bastante semelhante aos demais ensaios. A menor atenuação do mosto neste ensaio (88%) poderá ser atribuída à ausência de capacidade de assimilação de maltose de *K. apiculata* (Kurtzman *et al.*, 2010), o principal açúcar do mosto de cerveja.

Tabela 8- Principais características analíticas das cervejas de controlo e co-fermentadas no mosto *Stout*.

Ensaio	Controlo	DL	DS	K	P	T
Açúcares residuais (g.L⁻¹)*	4,54±0,28 ^a	7,77±0,41 ^a	6,42±0,13 ^a	9,47±1,42 ^a	3,95±0,16 ^a	6,63±0,37 ^a
°Brix	6,55±0,49 ^a	6,18±0,95 ^a	6,6±0,42 ^a	6,35±0,64 ^a	5,3±0,28 ^a	6,25±1,77 ^a
Glicerol (g.L⁻¹)	1,99±0,31 ^a	2,10±0,40 ^a	2,02±1,29 ^a	1,87±0,58 ^a	1,96±0,50 ^a	1,77±0,84 ^a
Etanol %(v/v)	4,33±0,23 ^b	4,52±0,17 ^{ab}	3,13±0,43 ^b	4,27±1,08 ^b	6,89±0,07 ^a	4,00±0,90 ^b
pH	4,40±0,01 ^a	4,33±0,02 ^a	4,32±0,15 ^a	4,26±0,03 ^a	4,29±0,2 ^a	4,37±0,01 ^a
Ácido acético (mg.L⁻¹)	396,1±138,9 ^a	519,8±190,5 ^a	609,5±312,0 ^a	649,9±64,6 ^a	922,5±531,1 ^a	360,1±329,1 ^a
Ácido succínico (mg.L⁻¹)	421,7±48,8 ^a	406,9±16,1 ^a	370,7±121,7 ^a	566,2±158,8 ^a	433,4±249,11 ^a	361,0±114,5 ^a
Ácido málico (mg.L⁻¹)	1469,7±493,8 ^a	1279,3±149,6 ^a	1151,8±612,1 ^a	2338,2±814,6 ^a	1949,4±718,5 ^a	1116,1±429,3 ^a
Valores são médias das fermentações duplicadas de cada ensaio ± desvio-padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha correspondem a valores médios significativamente distintos (p<0,05). *soma das concentrações finais de glucose, maltose e maltotriose.						

O nível de glicerol final das cervejas é bastante semelhante entre os ensaios, destacando-se somente o menor valor do ensaio T (1,77 g.L⁻¹), que está de acordo com os baixos níveis de produção deste poliál referidos na literatura (Loira *et al.*, 2014; Canonico *et al.*, 2016). De igual forma, o volume de etanol, apenas revela algumas diferenças pontuais, sendo que, a maioria dos ensaios se encontram dentro do intervalo previsto para este estilo de cerveja (4-7 %) (Boulton & Quain, 2008; Strong & England, 2015), com exceção da estirpe DS com um valor menor (3,13 %).

Em relação aos ácidos orgânicos sintetizados pelas leveduras, o padrão geral observável revela concentrações superiores de ácidos orgânicos nos ensaios co-fermentados em comparação com a cerveja de controlo (Tabela 8). Com exceção do ensaio T, que neste aspecto confirma a pureza da fermentação de *T. delbrueckii*, caracterizada pela reduzida produção de ácidos orgânicos, nomeadamente ácido acético (evidenciada também por (Renault *et al.*, 2009)), as restantes cervejas co-fermentadas com estirpes de leveduras não-convencionais revelam concentrações superiores de ácido acético, succínico e málico, e paralelamente um valor de pH inferior à cerveja controlo. De acordo com a literatura, as estirpes de *D. bruxellensis*, produzem elevadas concentrações de ácido acético (Steensels *et al.*, 2015), verificando-se na Tabela 8 a maior concentração destes ensaios face à maioria dos restantes ensaios. O ensaio K apresenta a concentração mais elevada de ácidos orgânicos, estando em concordância com estudos prévios realizados por (Zohre & Erten, 2002; Díaz-Montaña *et al.*, 2008; Bilbao *et al.*, 1997) mas somente no caso do ácido acético e málico, sendo que a elevada produção de ácido succínico contraria os estudos mencionados. A estirpe *S.cerevisiae* não-comercial (ensaio P) apresenta valores semelhantes aos do ensaio de controlo no que diz respeito à concentração de ácido succínico e málico, sendo que o elevado desvio-padrão da concentração de ácido acético torna o valor médio mais incerto.

4.2.2.2. Perfil aromático

A fracção aromática das cervejas, parcialmente apresentada na Tabela 9, revela poucas diferenças estatisticamente significativas entre os ensaios. Os resultados de GC não conseguem revelar a distinção notória entre o aroma das cervejas fermentadas detectada na análise sensorial preliminar. Em relação ao perfil aromático geral da fracção líquida da cerveja, o número de compostos totais detectados foi relativamente semelhante, indicando uma complexidade aromática das cervejas indiferenciada.

Tabela 9- Concentração de compostos voláteis presentes nas cervejas maturadas do estilo *Stout* (mg.L⁻¹), determinação por GC-FID.

Ensaio	Controlo	DL	DS	K	P	T
2- Fenil etanol	67,53±14,68 ^a	65,18±4,42 ^a	58,70±14,20 ^a	68,54±1,48 ^a	64,87±10,96 ^a	53,17±12,64 ^a
2,3- Butanediol	16,38±1,88 ^a	17,49±0,33 ^a	16,98±2,62 ^a	18,28±0,59 ^a	18,66±0,35 ^a	20,99±4,62 ^a
Alcool amílico	113,12±55,57 ^a	90,96±19,93 ^a	70,60±35,47 ^a	100,42±8,82 ^a	80,38±17,72 ^a	55,68±51,20 ^a
4- Etil guaiacol	8,18±0,18 ^b	8,68±0,46 ^{ab}	9,17±0,2 ^a	8,67±0,33 ^{ab}	8,40±0,05 ^{ab}	7,98±0 ^b
Nº compostos*	23±1,41 ^a	21±2,83 ^a	26±2,83 ^a	24±1,41 ^a	24,5±0,7 ^a	20±4,24 ^a
Valores são média das fermentações realizadas em duplicado para cada ensaio ± desvio-padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha correspondem a valores médios significativamente distintos (p<0,05). * número absoluto de compostos detectado por GC-FID.						

Em relação ao primeiro composto volátil, 2- fenil etanol, um álcool superior, cuja aroma é normalmente associado a descritores como “rosas” e “floral”, verifica-se que as concentrações finais da cerveja maturada *Stout* não diferem significativamente entre os ensaios. Os valores absolutos são realmente muito pouco distintos adivinhando-se pouca diferença na capacidade produtiva deste álcool superior entre as leveduras. De realçar somente a menor concentração do ensaio T deste composto (53,17 mg.L⁻¹) em relação ao controlo (67,53 mg.L⁻¹), encontrando-se em concordância com o estudo de (Canonico *et al.*, 2016).

O composto volátil diacetilo, tendo em conta o seu baixo limite de detecção (0,1-0,4 mg.L⁻¹), é conhecido por incutir na cerveja um *off-flavour* caracterizado pelo aroma a manteiga, procurando-se limitar a sua concentração na cerveja. O composto 2,3-butanediol, cujo limite de detecção em cerveja ronda 4500 mg.L⁻¹, não afectando, portanto, o *flavour* ou aroma da cerveja, é produzido através da redução química de diacetilo via acetoína (Krogerus & Gibson, 2013). Assim, poderá estabelecer-se uma relação inversamente proporcional entre a concentração de 2,3- butanediol e diacetilo, deduzindo que concentrações mais elevadas do primeiro serão indicativas de menor concentração do segundo. Consegue-se observar na Tabela 9 que, apesar de não diferir significativamente, o valor médio da concentração nos ensaios co-fermentados é ligeiramente superior ao controlo, deduzindo maior redução de diacetilo, ainda que seja uma dedução prematura e necessitada de investigação posterior para validação. Todavia, o estudo dos autores (Loira *et al.*, 2014) observou que os ensaios co-fermentados de *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* produziram menor concentração de 2,3-Butanediol em

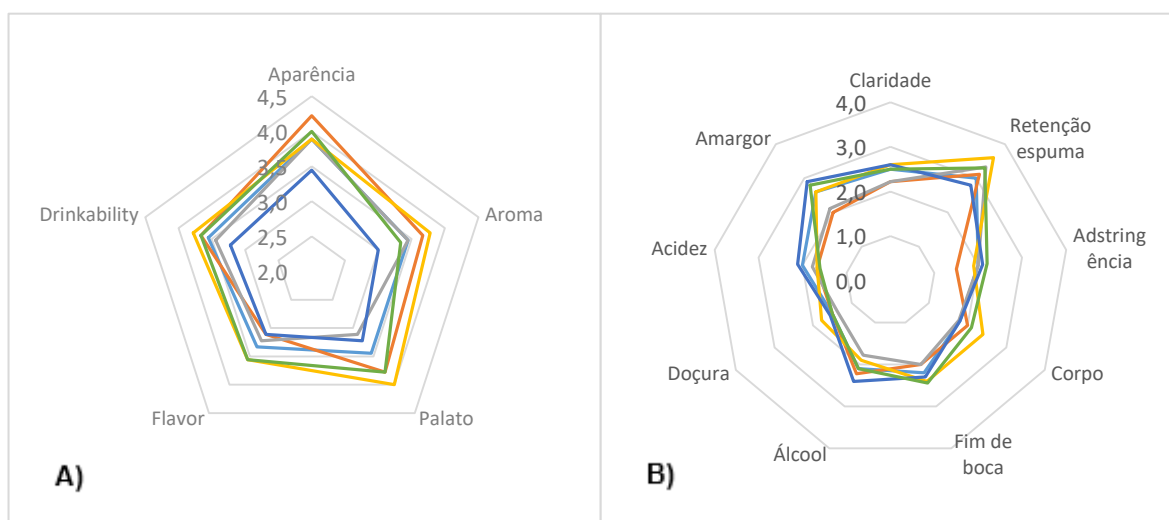
detrimento de ensaios exclusivamente fermentados com *S. cerevisiae*, contrariando a relação que se observa na Tabela 9 para os ensaios T e controlo, apesar do estudo mencionado ter sido conduzido em mosto de uva.

Em relação ao álcool amílico, responsável por aromas e sabores de “solvente”, “álcool”, “vinícola”, apresenta, nos resultados dos ensaios *Stout*, concentrações ligeiramente superiores ao seu limite de detecção (50-100 mg.L⁻¹) (Engan, 1972). Os ensaios de controlo e K revelam maiores concentrações deste álcool superior, assumindo o ensaio T a menor concentração do grupo.

O composto fenólico 4- etil guaiacol revela ser único cujas concentrações reflectem o cenário esperado e em concordância com a bibliografia existente (Steensels *et al.*, 2015; Crauwels *et al.*, 2015), observando-se maior produção por parte das estirpes de *D. bruxellensis* em relação às restantes estirpes de levedura utilizadas.

4.2.2.3. Análise sensorial

Com vista à detecção de variações a nível sensorial nas cervejas que, de algum modo poderia contrariar a igualdade observada nas determinações do perfil físico-químico e aromático, foi realizada uma análise sensorial com painel de cervejeiros. Esta análise foi conduzida no sentido de testar a forma como as características físico-químicas das cervejas se expressam a nível sensorial.



As cervejas do estilo *Stout* foram as únicas para as quais, do ponto de vista sensorial, todos os ensaios co-inoculados revelaram resultados interessantes e portanto passíveis de serem objecto de análise sensorial mais aprofundada. Consegue-se observar na Figura 23A que as cervejas co-inoculadas possuem, de forma geral, uma melhor classificação nos parâmetros básicos em comparação com a

cerveja de controlo. No atributo aroma, os valores médios dos ensaios co-fermentativos K (3,78) e DL (3,67) foram superiores ao da cerveja de controlo: 3,44. Igualmente, em termos de *flavour*, palato e *drinkability*, os ensaios co-fermentados com estirpes experimentais K e T obtiveram as melhores classificações: 3,56, 4 e 3,78 (ensaio K); 3,56, 3,78 e 3,67 (ensaio T), respectivamente. Evidencia-se ainda a menor classificação da cerveja P dentro do estilo *Stout*, cuja apreciação dos parâmetros gerais foi a menor do grupo.

Aprofundando estas categorias genéricas (Figura 23B), as propriedades de palato demonstram a diferença observada na Tabela 8 a nível de esgotamento do substrato: a estirpe *K. apiculata* responsável pela produção de uma cerveja com mais corpo, um fim de boca mais prolongado, bem como uma percepção de doçura superior, atributos assim percebidos devido à maior concentração de açúcares residuais deste ensaio (9,47 g.L⁻¹). A retenção de espuma e claridade da cerveja são características fundamentais na avaliação da aparência geral de uma cerveja, no entanto, encontra-se dependente do estilo. Observa-se que o ensaio DL ao se classificar a claridade como “opaca” e retenção de espuma “moderada” resultou na melhor classificação geral da aparência (4,22) do estilo *Stout*. As diferenças de aspecto visual das cervejas *Stout* podem ser observadas no Anexo IX.

A percepção da concentração de álcool na figura 23B coaduna-se com os valores observados nos resultados do perfil físico-químico (Tabela 8): a cerveja do ensaio P é caracterizada como a mais alcoólica. Porém, apesar do teor alcoólico comparativamente superior aos restantes ensaios, verificou-se que sensorialmente, esta característica não pesou na qualidade final da cerveja, uma vez que 50% dos provadores classificaram como “suave” este parâmetro na cerveja *Stout* do ensaio P. A menor percepção de álcool no ensaio DS, por outro lado, poderá ser um atributo que pese negativamente na classificação geral, pois o teor alcoólico desta cerveja (3,13 %) encontra-se abaixo do previsto para o estilo *Stout* (4-7%). Verifica-se que no atributo acidez, a cerveja do ensaio P é novamente aquela cuja percepção é mais evidente, coadunando-se com o valor de pH aferido (4,29), sendo um dos ensaios com menor valor. Contudo, como foi observado, não existem diferenças significativas entre os valores de pH, o que confirma que a análise estatística pode não reflectir diferenças perceptíveis em termos sensoriais. A diferença que se observa em termos de amargor das cervejas experimentais e de controlo, apesar do mosto ser idêntico em termos de adição de lúpulo, revela a influência da levedura e das condições de fermentação na percepção final deste atributo. Os resultados sugerem dois grupos distintos e bem definidos, sendo que num, formado exclusivamente pelas cervejas co-inoculadas com *D. bruxellensis*, a percepção do amargor é claramente inferior ao segundo grupo, formado pelos restantes ensaios, percebidas todas elas como mais amargas.

A análise sensorial da componente aromática das cervejas, além da avaliação sumária do atributo Aroma, previa a selecção de descritores mais evidentes na cerveja em análise (Anexo VIII, Tabela 32). Para o estilo *Stout*, além de descritores comuns associados ao estilo e claramente evidentes em todos os ensaios como “chocolate”, “café”, “caramelo” e “torrado”, nas cervejas co-fermentadas foi identificada uma maior gama de aromas, sendo detectados aromas como “biscoito”, “cítrico” ou

“fumado” nas cervejas co-fermentadas com *D. bruxellensis*; “pinho” e “toffee” no ensaio K; “frutado” e “floral” no caso da cerveja co-fermentada P; e por fim, na cerveja do ensaio T, além de incluir todos os descritores já mencionados acrescenta ainda aromas como “rosas” e “nozes” ao seu perfil aromático. Esta análise contradiz os resultados de GC (Tabela 9), uma vez que o número de compostos detectados nessa determinação estabelece um padrão distinto daquele averiguado na análise sensorial. Os resultados de GC ainda evidenciam outro paradoxo: apesar do painel ter detectado maior intensidade de aroma “rosas” na cerveja T, a concentração do álcool superior responsável por este aroma, 2- fenil etanol, é inferior neste ensaio.

Tabela 10- Avaliação final das cervejas do estilo *Stout*.

Ensaio	Controlo	DL	DS	K	P	T
Adequação ao estilo (% sim)*	78%	89%	78%	89%	56%	56%
Intenção de compra (0-5)**	3,3±0,62	3,6±0,88	3,2±0,97	3,7±0,87	2,6±0,78	4,1±0,93
Classificação geral (0-10)**	6,3±0,94	6,6±2,18	6,2±1,78	7,6±0,93	5,6±1,69	7±2,18
* Valor percentual do número de provadores que consideraram a cerveja em análise adequada ao estilo. **Valores são médias das classificações do painel de provadores ± desvio-padrão.						

Relacionando os resultados discutidos com os valores submetidos em termos de intenção de compra e adequação da cerveja ao estilo (Tabela 10), o facto da cerveja de controlo não ser aquela cuja maior percentagem dos provadores respondeu afirmativamente reveste-se de enorme importância, dentro da pesquisa fundamental desta dissertação. Os ensaios co-inoculados criaram produtos distintos, porém adequados ao estilo em que se insere. Todavia, os ensaios P e T apenas obtiveram 56% de aprovação para adequação ao estilo *Stout*, parcialmente justificado, no caso do ensaio P pelo fraco corpo, média/elevada adstringência e elevada acidez, pouco característicos no estilo *Stout* (Strong & England, 2015). Por outro lado a cerveja *Stout* T, provavelmente devido à complexidade aromática, que em termos hedónicos reflectiu-se num valor ligeiramente mais baixo do atributo geral Aroma (3,33), ou devido à maior adstringência e fim de boca mais prolongado (Figura 23B), levando o painel a duvidar da inclusão desta cerveja no estilo *Stout*.

Ainda assim, a intenção de compra espelha claramente a predisposição de compra de produtos inovadores, pois, à excepção da cerveja P e em menor grau da cerveja DS, o valor médio de intenção de compra é superior nos ensaios co-fermentados (3,45) em relação à cerveja de controlo (3,33). Neste parâmetro evidencia-se a cerveja T, sendo que cerca de 45% dos provadores afirmaram que de certeza que comprariam. A intenção de compra é confirmada pela classificação geral atribuída às cervejas, superior nos ensaios K (7,6) e T (7), apesar de haver maior consenso em relação à qualidade da cerveja K, denunciada pelo menor desvio-padrão do grupo.

É evidente que, com a excepção do ensaio P, cujos atributos negativos já mencionados impedem de melhor classificação, que todos os outros ensaios co-fermentados revelam uma boa aceitabilidade, sugerindo superioridade sensorial em relação ao ensaio de controlo.

4.3. Estilo Weiss

4.3.1. Evolução do ensaio fermentativo

4.3.1.1. Evolução da microbiota

O desenvolvimento das leveduras no mosto Weiss, através da observação da evolução de células totais (Figura 24A), distingue dois grupos: 1º) ensaios K e controlo, cuja entrada na fase estacionária ocorre 24 horas após inoculação; 2º) restantes ensaios, que atingem a fase estacionária somente às 72 horas de fermentação. Dentro do primeiro grupo, o ensaio K, tal como seria expectável dada a concentração de inóculo mais elevada ($1,98 \times 10^6$ cel.mL⁻¹) apresenta igualmente uma elevada taxa específica de crescimento ($0,145$ h⁻¹), somente inferior ao ensaio de controlo ($0,188$ h⁻¹). Os ensaios co-inoculados com estirpes de *D. bruxellensis* exibem um comportamento similar, apresentando uma taxa específica de crescimento bastante similar e simultaneamente inferior à maioria dos restantes ensaios: $0,086$ h⁻¹ e $0,70$ h⁻¹ para as estirpes DL e DS respectivamente. Observa-se, no mosto Weiss, que a estirpe não-comercial de *S.cerevisiae* do ensaio P se distancia significativamente da estirpe comercial BB, pois além de atingir a fase estacionária mais tardiamente (72 horas), apresenta uma taxa específica de crescimento menor ($0,105$ h⁻¹). O ensaio T apresenta igualmente uma menor taxa específica de crescimento ($0,072$ h⁻¹). Apesar do desenvolvimento diferenciado dos ensaios, estes convergem para concentrações celulares finais similares, situadas entre $5,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ cel.mL⁻¹, como se pode observar pela sobreposição quase indistinguível dos ensaios no último momento da fermentação.

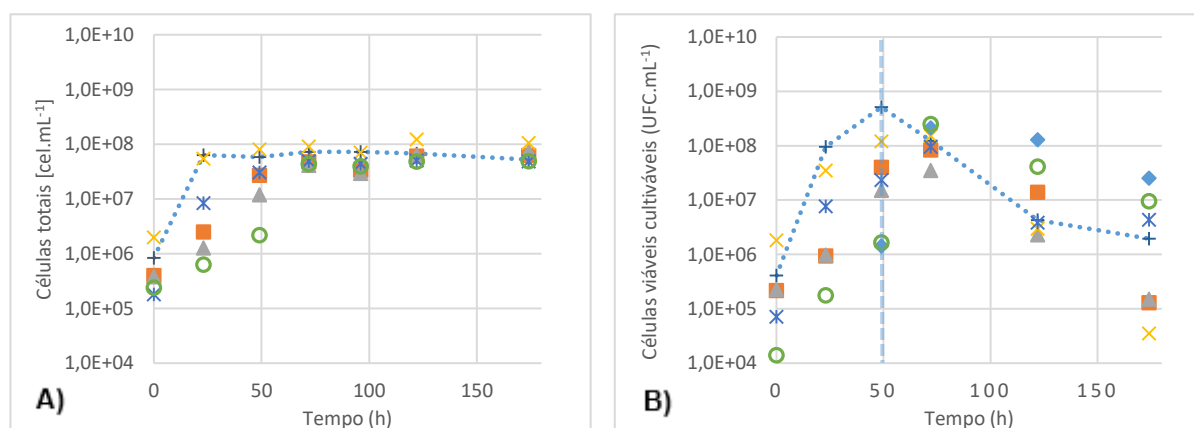


Figura 24- Curvas de crescimento das leveduras durante fermentações co-inoculadas e de controlo (mosto Weiss). A - Evolução da concentração de células totais. B - Evolução da concentração de células viáveis cultiváveis. Os valores apresentados no gráfico B da estirpe BB (co-inóculo) resultam da média de valores observados em cada ensaio co-fermentado. Os valores do ensaio T no gráfico B correspondem a células viáveis cultiváveis totais, ou seja, estirpe T + BB. Linha vertical tracejada simboliza momento da inoculação da estirpe comercial BB nos ensaios co-fermentados.

Símbolos: (+) Controlo; (♦) Co-inóculo BB; (■) DL; (▲) DS; (×) K; (✕) P; (○) T.

As diferenças do desenvolvimento microbiano verificado pela variação do número de células totais são ainda mais notórias nas células viáveis cultiváveis (Figura 24B). Em relação à capacidade de multiplicação dos inóculos iniciais, observa-se uma diferença muito dilatada, desde $1,83 \times 10^6$ cel.mL⁻¹ no ensaio K até $1,40 \times 10^4$ cel.mL⁻¹ de concentração celular com capacidade reprodutiva no ensaio T.

Devido a esta distinção, e tendo em conta a taxa específica de crescimento menor do ensaio T, no momento de co-inoculação (48 h) o número de células viáveis cultiváveis neste ensaio encontra-se numa concentração ($1,65 \times 10^6$ cel.mL⁻¹) praticamente idêntica à concentração inicial dos ensaios K e controlo. Os restantes ensaios apresentam um número de células viáveis cultiváveis acima de 1×10^7 cel.mL⁻¹, com um máximo de $1,21 \times 10^8$ cel.mL⁻¹ no ensaio K. A estirpe comercial BB co-inoculada atinge a fase estacionária ao fim de 24 horas, com um número máximo de células viáveis cultiváveis de $2,14 \times 10^8$ cel.mL⁻¹, sendo, a partir desse momento, a levedura dominante em todos os ensaios. Paralelamente, observa-se o decréscimo da capacidade reprodutiva das leveduras não-convencionais. O efeito da presença da estirpe comercial incorre no mesmo padrão dos ensaios co-fermentativos homólogos do mosto *Stout*, contudo, verifica-se que a sua influência provocou uma quebra mais acentuada na capacidade de multiplicação das leveduras não-convencionais. Além disso, é notória a superioridade genética da estirpe BB em termos de adaptação ao substrato, pois o ensaio de controlo atinge um número muito elevado de células ($5,13 \times 10^8$ cel.mL⁻¹), apesar de claramente contrariar os resultados do número de células totais (Figura 24A). A perda de capacidade de multiplicação como consequência da presença estirpe BB é mais notória nas leveduras não-*Saccharomyces*, reduzindo-se a concentrações próximas da utilizada na inoculação, no caso dos ensaios DL ($1,30 \times 10^5$ cel.mL⁻¹) e DS ($1,50 \times 10^5$ cel.mL⁻¹) ou inferiores, no caso da estirpe de *K. apiculata* ($3,50 \times 10^4$ cel.mL⁻¹). Observando a sobreposição dos pontos da série T e BB após co-inoculação, pode-se inferir que a concentração de células viáveis cultiváveis do ensaio T pertencentes à estirpe de *T. delbrueckii* foi igualmente reduzida após inoculação da estirpe comercial. Este facto, bem como a menor susceptibilidade da estirpe *S. cerevisiae* P poderá dever-se à presença da estirpe comercial a par do que foi já largamente referido por vários autores (Barrajón *et al.*, 2011; Branco *et al.*, 2014; Albergaria *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014a). No entanto, atendendo a que mesmo no ensaio controlo se observa uma redução acentuada da culturabilidade, os resultados apontam para que esta ocorrência não se deva somente à interação entre as leveduras, indiciando algo no mosto que precipitou esta ocorrência mesma nas estirpes melhor adaptadas e resistentes de *S. cerevisiae*. Deverá assim ter existido algum factor abiótico adicional que leve à quebra abrupta de capacidade reprodutiva logo após 48 h de fermentação, provavelmente devido ao esgotamento de nutrientes ou devido à concentração de etanol.

Os resultados referentes à população viável de cada estirpe nas co-culturas (Figura 25A) revelam alguma morte celular, contudo, o decréscimo do número de células viáveis é bem menos significativo que a perda de culturabilidade.

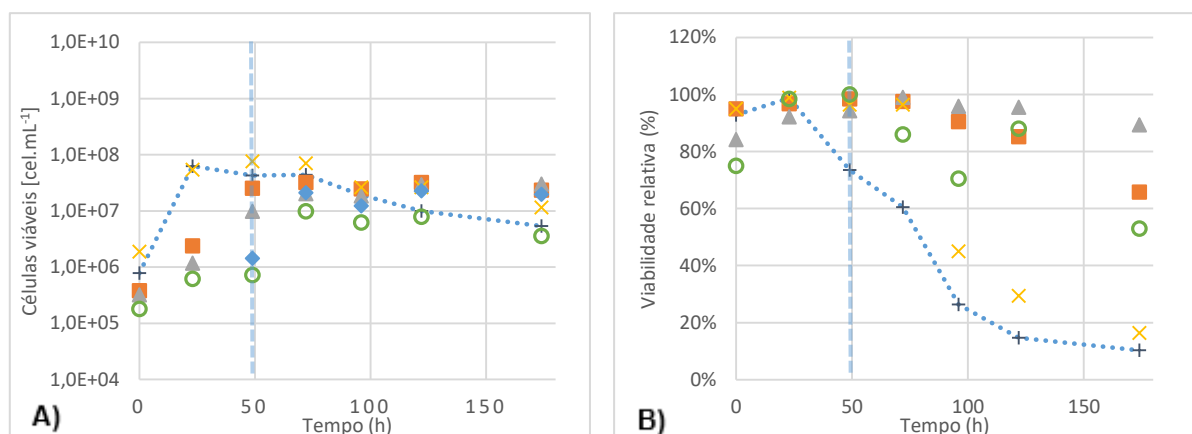


Figura 25- Evolução da viabilidade nos ensaios fermentativos no mosto Weiss. A) Evolução da concentração de células viáveis (Os valores apresentados no gráfico B da estirpe BB (co-inóculo) resultam da média de valores observados em cada ensaio co-fermentado); B) Evolução da viabilidade relativa ($vr = \text{cel.viáveis} / \text{cel.totais}$). Linha vertical tracejada simboliza momento da inoculação da estirpe comercial BB. nos ensaios co-fermentados. Símbolos: (+) Controlo; (♦) Co-inóculo BB; (■) DL; (▲) DS; (X) K; (*) P; (○) T.

Em traços gerais, a Figura 25A espelha um cenário mitigado da evolução da concentração de células verificada na Figura 24B, observando-se mesmo ensaios em que não se regista diminuição do número de células viáveis após inoculação da estirpe BB, finalizando o ensaio fermentativo a concentrações na ordem de grandeza de $2,0 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$, no caso dos ensaios de *D. bruxellensis* (DL e DS). Por outro lado, a reduzida concentração de células viáveis da estirpe *T. delbrueckii* no momento de co-inoculação ($7,20 \times 10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$) fundamenta o fraco desempenho desta estirpe, finalizando a fermentação a uma concentração de $3,60 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$. O comportamento da estirpe *K. apiculata*, em termos de células viáveis, encontra-se em concordância com os resultados apresentados anteriormente na Figura 1B, sendo que esta levedura revela a diminuição mais acentuada do número de células viáveis após o momento de co-inoculação: $5,67 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$. Para a maioria das culturas, a curva de crescimento expressa em número de células viáveis vs tempo (Figura 25A) não exibe uma fase pós-inoculação com um declínio muito pronunciado. Assim, nos ensaios co-inoculados com leveduras não-convencionais, a maioria das células retêm capacidade metabólica, tendo, porém, capacidade de reprodução limitada. Observa-se ainda que a estirpe comercial não se assume como levedura predominante nos ensaios co-fermentados, sendo a sua concentração de células viáveis somente superior no último momento de fermentação, e apenas nos ensaios K e T.

Atendendo agora à viabilidade relativa (Figura 25B), verifica-se que, não obstante o facto de todas as estirpes não-*Saccharomyces* apresentarem uma viabilidade próxima de 100% no momento de co-inoculação, como já se observou no mosto Stout, a variação da viabilidade relativa na presença de *S.cerevisiae* é bastante distinta entre ensaios. Observa-se que, excluindo a estirpe de *K. apiculata*, que atinge um valor residual de 16% no fim do ensaio fermentativo, os restantes ensaios são caracterizados pela manutenção do número de células viáveis superior às não-viáveis, enfatizando a resistência das estirpes de *Dekkera*, especificamente a DS, cuja viabilidade relativa permanece quase inalterada, finalizando a fermentação com 89% de células viáveis.

A Tabela 11 valida novamente a hipótese de interação positiva entre as estirpes de *S.cerevisiae* (Barrajón *et al.*, 2010), uma vez que a viabilidade total final do ensaio P é a mais elevada do grupo, apesar de possuir uma viabilidade inicial comparativamente inferior. Observa-se que os ensaios DL e DS retêm uma elevada viabilidade relativa, 71% e 78%, respectivamente. Por outro lado, a baixa concentração relativa de células viáveis das estirpes *K. apiculata*, *T. delbrueckii* e estirpes comerciais BB são responsáveis pela baixa viabilidade relativa final dos ensaios K e T, 21% e 46%, respectivamente.

Tabela 11- Viabilidade relativa inicial e final dos ensaios co-fermentativos (mosto Weiss)

Ensaio	DL			DS			K			P			T		
Levedura	DL	BB	Total	DS	BB	Total	K	BB	Total	P	BB	Total	T	BB	Total
Inicial	95%	97%	-	84%	97%	-	95%	97%	-	67%	97%	-	75%	97%	-
Final	66%	77%	71%	89%	69%	78%	16%	30%	21%	-	-	81%	53%	45%	46%

Em relação aos aspectos microbiológicos obtidos nos ensaios Weiss o principal aspecto a realçar é a inibição evidente da capacidade de multiplicação das estirpes selvagens após co-inoculação com *S. cerevisiae* BB não se traduzir em perda da capacidade metabólica total. Inversamente ao verificado nos ensaios Stout, em que o domínio da estirpe comercial sobre as demais leveduras é evidente, no caso do mosto Weiss, a preponderância da levedura comercial BB é, na maioria dos casos, apenas evidente em termos de células viáveis cultiváveis.

4.3.1.2. Evolução físico-química

Os resultados dos ensaios fermentativos do mosto Weiss, a nível físico-químico (Figura 26), permitem a observação de uma fase inicial de adaptação em que o consumo de açúcares e produção de etanol é reduzido. Esta fase corresponde a uma fase de adaptação às condições de fermentação e prolonga-se até 24 horas de fermentação. Outra conclusão geral refere-se ao consumo dos açúcares, mais evidente nos ensaios DS, controlo e T, em que se observa que o ritmo de consumo de maltose claramente aumenta quando a glucose atinge concentrações residuais, o que poderá ser atribuído à repressão catabólica exercida pela glucose.

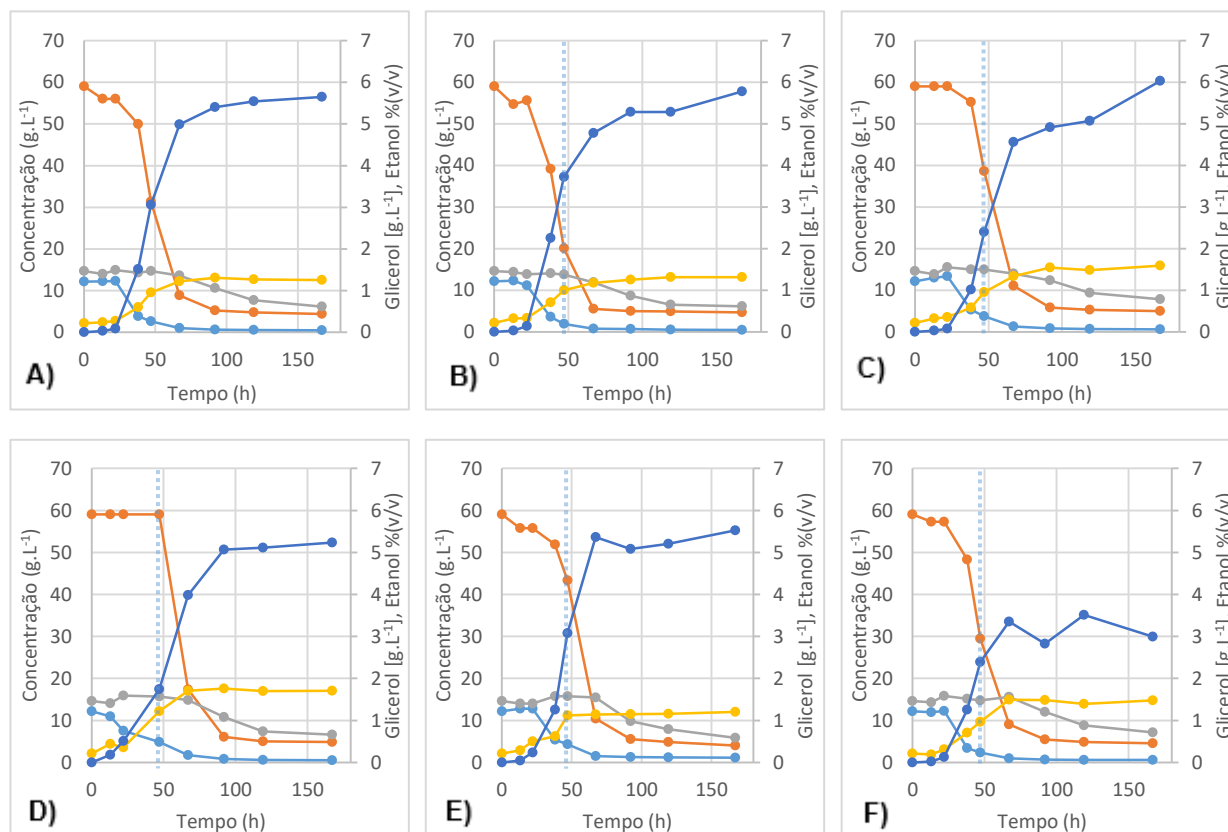


Figura 26- Consumo de açúcares e produção de glicerol e etanol nos ensaios de mosto Weiss. A) Ensaio de controlo; B) Ensaio co-fermentado com *D. bruxellensis* DL; C) Ensaio co-fermentado com *D. bruxellensis* DS; D) Ensaio co-fermentado com *K. apiculata*; E) Ensaio co-fermentado com *S. cerevisiae* P; F) Ensaio co-fermentado com *T. delbrueckii*. Linha vertical tracejada simboliza momento da inoculação da estirpe comercial BB nos ensaios co-fermentados. Legenda: —●— GLUCOSE —●— MALTSE —●— MALTOTRIOSE —●— GLICEROL —●— ETANOL

O ensaio de controlo inoculado com a estirpe comercial BB, revela uma fermentação muito semelhante aos ensaios co-inoculados, apresentando um rendimento em etanol ($0,60 \text{ g.g}^{-1}$) e glicerol ($0,014 \text{ g.g}^{-1}$) e uma velocidade de consumo de açúcares ($0,45 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Os ensaios DL e DS apresentam novamente uma fermentação quase idêntica entre si e igualmente semelhante ao ensaio de controlo em termos de rendimento em etanol ($0,61$ e $0,65 \text{ g.g}^{-1}$) e velocidade de consumo de açúcares ($0,47$ e $0,43 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e estirpes DL e DS, respectivamente. No ensaio K é importante referenciar que a fermentação apresenta um rendimento superior de glicerol ($0,02 \text{ g.g}^{-1}$) e consequentemente uma menor produção de etanol ($0,56 \text{ g.g}^{-1}$), padrão em linha com o descrito na literatura para a espécie *K. apiculata* (Zohre & Erten, 2002; Díaz-Montaña *et al.*, 2008). O ensaio P revela uma fermentação bastante semelhante à de controlo em relação ao rendimento em etanol ($0,58 \text{ g.g}^{-1}$) e glicerol ($0,013 \text{ g.g}^{-1}$). Nota-se, porém, uma baixa velocidade de consumo de maltose neste ensaio nas primeiras 48 horas de fermentação ($0,48 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), sendo, aliás, inferior à estirpe de *T. delbrueckii* do ensaio T ($0,83 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), cuja a capacidade de assimilação e fermentação de maltose (ainda que dependente da estirpe) é inferior à espécie *S.cerevisiae* (Alves-Araújo *et al.*, 2007; Bely *et al.*, 2008). Todavia a viabilidade menor do ensaio P (67%) (Tabela 11) poderá fundamentar a menor velocidade de consumo de maltose observada. O comportamento da estirpe de *T. delbrueckii*, co-responsável pela fermentação do mosto Weiss, ensaio T, é coerente com a caracterização já referida desta levedura (Bely *et al.*, 2008; Loira *et*

al., 2014), claramente inferior na capacidade de produção de etanol ($0,32 \text{ g.g}^{-1}$) em relação à espécie *S. cerevisiae*, apesar do consumo acelerado de maltose já mencionado.

4.3.2. Produto final

4.3.2.1. Perfil físico-químico

De forma semelhante aos ensaios do mosto *Stout*, a Tabela 12, que sumariza a descrição físico-química dos ensaios fermentativos do mosto *Weiss*, demonstra não existirem diferenças significativas para os vários parâmetros considerados.

Tabela 12- Principais características analíticas das cervejas de controlo e co-fermentadas no mosto *Weiss*.

Ensaio	Controlo	DL	DS	K	P	T
Açúcares residuais (g.L^{-1})*	$7,10 \pm 0,96^a$	$5,26 \pm 0,26^a$	$6,72 \pm 0,25^a$	$5,83 \pm 0,23^a$	$5,05 \pm 0,28^a$	$7,63 \pm 0,76^a$
°Brix	$6,2 \pm 0,28^a$	$5,9 \pm 0,71^a$	$6,1 \pm 0,85^a$	$6,25 \pm 0,07^a$	$5,3 \pm 0,71^a$	$6,15 \pm 0,49^a$
Glicerol (g.L^{-1})	$1,22 \pm 0,05^a$	$1,89 \pm 0,83^a$	$2,17 \pm 0,83^a$	$1,76 \pm 0,07^a$	$1,15 \pm 0,01^a$	$1,37 \pm 0,15^a$
Etanol % (v/v)	$4,22 \pm 0,46^a$	$4,15 \pm 0,79^a$	$3,83 \pm 0,72^a$	$4,86 \pm 0,02^a$	$5,69 \pm 1,55^a$	$3,33 \pm 0,47^a$
pH	$4,35 \pm 0,3^a$	$4,19 \pm 0^a$	$4,14 \pm 0,08^a$	$4,49 \pm 0,23^a$	$4,46 \pm 0,33^a$	$4,22 \pm 0,04^a$
Ácido acético (mg.L^{-1})	$1366,1 \pm 876,7^a$	$1995,8 \pm 208,5^a$	$1715,9 \pm 502,2^a$	$1385,4 \pm 520,6^a$	$794,84 \pm 555,7^a$	$1304 \pm 1064,2^a$
Ácido succínico (mg.L^{-1})	$553,0 \pm 50,6^a$	$526,9 \pm 141,9^a$	$644,6 \pm 224,6^a$	$770,3 \pm 263,3^a$	$749,6 \pm 189,1^a$	$578,6 \pm 313,4^a$
Ácido málico (mg.L^{-1})	$1211 \pm 411,8^a$	$1210,7 \pm 609,5^a$	$1398,3 \pm 499,4^a$	$1513,5 \pm 674,4^a$	$1142,2 \pm 62,9^a$	$1353,7 \pm 307,6^a$
Valores são médias das fermentações realizadas em duplicado para cada ensaio \pm desvio-padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha correspondem a valores médios significativamente distintos ($p < 0,05$). *soma das concentrações finais de glucose, maltose e maltotriose.						

Os ensaios co-fermentados, exibem, em traços gerais, uma baixa concentração de açúcares residuais comparativamente ao valor obtido no ensaio de controlo ($7,1 \text{ g.L}^{-1}$), com excepção do ensaio T em que a concentração de açúcares residuais foi mais próxima da obtida no controlo ($7,63 \text{ g.L}^{-1}$). Apesar deste padrão não se encontrar totalmente de acordo com os valores de °brix, é notória a maior assimilação de açúcares nos ensaios co-inoculados. A concentração de açúcares residuais entre os ensaios co-fermentados difere pouco, reflexo do padrão de fermentação similar observado na Figura 26, mesmo equacionando as diferenças verificadas a nível microbiológico (Figuras 24 e 25). Por exemplo, a espécie de *K. apiculata* foi a mais afectada pela presença de *S. cerevisiae* BB, contudo, a atenuação do substrato deste ensaio (94%) foi superior ao controlo (92%). O ensaio P apresenta um consumo de substrato mais completo (95%) com o valor de açúcares mais residual do grupo ($5,05 \text{ g.L}^{-1}$), bem como um valor de °brix inferior (5,3). As estirpes de *Dekkera bruxellensis*, possivelmente devido à capacidade superior de utilização de açúcares complexos (Crauwels *et al.*, 2015), especificamente a estirpe DL, apresenta um esgotamento igualmente elevado dos açúcares presentes no mosto (94%).

Relativamente à concentração de glicerol, os valores mais elevados pertencem igualmente aos ensaios co-inoculados com estirpes não-*Saccharomyces*, nomeadamente *K. apiculata* e *D. bruxellensis*. Esta

situação não se verifica, no entanto, para a estirpe *T. delbrueckii* que apresenta uma baixa concentração de glicerol ($1,37\text{g.L}^{-1}$), apenas suplantado pelos ensaios fermentados exclusivamente com estirpes de *S. cerevisiae* (controlo e P).

O teor alcoólico das cervejas (% (v/v)) é bastante similar entre os ensaios de controlo, DL, DS e K, introduzindo, verificando-se, todavia, alguma variação nos ensaios P e T, sendo as cervejas de maior e menor concentração de etanol, respectivamente. As concentrações de etanol da maioria dos ensaios encontram-se dentro dos limites esperados para o estilo *Weiss* (4,0-5,6%) (Strong & England, 2015), com excepção do ensaio T, que obteve apenas 3,33 % de etanol.

A nível do pH e concentração de ácidos orgânicos, os ensaios DL e DS apresentam maior concentração de ácido acético, característico da espécie *D. bruxellensis* (Steensels *et al.*, 2015) e paralelamente menor valor de pH: 4,19 (DL) e 4,14 (DS). Destaca-se a maior produção de ácido málico do ensaio K, face à estirpe controlo, em concordância com os dados de (Bilbao *et al.*, 1997). Há ainda que mencionar o elevado valor de pH (4,49) deste ensaio, superior aos demais ensaios *Weiss*. A produção moderada de ácidos orgânicos das estirpes de *Torulaspora* e de *Saccharomyces*, em comparação com as demais, era expectável (Lu *et al.*, 2015; Tataridis *et al.*, 2013; Loira *et al.*, 2014), apesar do elevado desvio-padrão poder introduzir incerteza no resultado.

4.3.2.2. Perfil aromático

Os resultados de GC-FID das cervejas de estilo *Weiss* (Tabela 13) são estatisticamente idênticos. O número absoluto de compostos, contudo, evidencia de certa forma a premissa já mencionada da possibilidade de maior complexidade aromática das cervejas co-fermentadas em comparação com a de controlo, destacando as cervejas P e T.

Tabela 13 - Concentração de compostos voláteis presentes nas cervejas do estilo *Weiss* (mg.L^{-1}), determinação por GC-FID.

Ensaio	Controlo	DL	DS	K	P	T
2- Fenil etanol	49,25±0,71 ^a	57,17±16,95 ^a	46,99±3,08 ^a	50,82±3,18 ^a	53,71±3,91 ^a	47,77±5,86 ^a
2,3- Butanediol	26,10±17,48 ^a	37,13±6,11 ^a	42,50±3,07 ^a	15,89±2,11 ^a	26,21±13,61 ^a	36,64±21,31 ^a
Álcool amílico	47,41±12,41 ^a	41,99±38,08 ^a	37,74±25,18 ^a	24,80±7,82 ^a	41,55±20,65 ^a	23,50±2,87 ^a
4- Etil guaiacol	7,92±0,17 ^a	8,48±0,38 ^a	8,28±0,23 ^a	7,78±0,03 ^a	7,90±0,01 ^a	7,87±0,02 ^a
Nº compostos*	16±8,48 ^a	22±7,07 ^a	20,5±3,54 ^a	17±4,24 ^a	23,5±2,12 ^a	23,5±3,54 ^a
Valores são médias das fermentações realizadas em duplicado para cada ensaio ± desvio-padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha correspondem a valores médios significativamente distintos ($p<0,05$). * número absoluto de compostos detectado por GC-FID.						

No caso da cerveja *Weiss*, é importante de quantificar o álcool amílico, uma vez que é um precursor essencial na síntese do éster acetato isoamílico que, por sua vez, possui um aroma característico a banana, muito apreciado neste estilo. Assim sendo, tendo em conta os resultados da Tabela 13, as espécies de *S. cerevisiae* apresentam maior concentração deste precursor, sugerindo maior intensidade deste aroma nas cervejas fermentadas por estas estirpes. A maior produção deste álcool

superior em estirpes de *Saccharomyces* em detrimento de não-*Saccharomyces* já foi evidenciada (Rojas *et al.*, 2003; Canonico *et al.*, 2016)

Em relação ao composto 2,3- Butanediol, com excepção do ensaio K, nos restantes ensaios co-fermentados com estirpes não-*Saccharomyces* foi detectada uma concentração comparativamente elevada, inferindo a maior capacidade de redução de diacetilo por parte das estirpes utilizadas de *D. bruxellensis* e de *T. delbrueckii*, algo já observado no estilo *Stout*.

A maior concentração de 4- etil guaiacol nas cervejas DL e DS confirma a síntese de concentrações mais elevadas de compostos fenólicos característico de *D. bruxellensis* (Crauwels *et al.*, 2015; Steensels *et al.*, 2015).

4.3.2.3. Análise sensorial

Os resultados da análise sensorial dos ensaios no estilo *Weiss* apenas incluem 4 das 6 cervejas produzidas, devido à exclusão das cervejas DL e DS, nas quais foram detectadas um perfil sensorial desagradável, não se revelando aptas para análise sensorial.

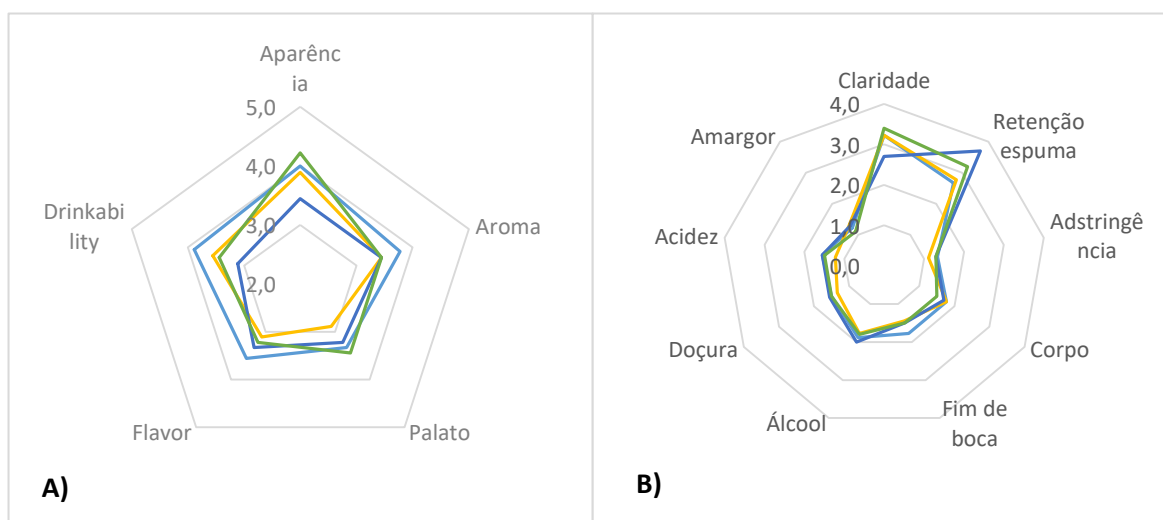


Figura 27- Resultados análise sensorial cervejas Weiss. A) Gráfico rede das classificações dos parâmetros gerais. B) Gráfico rede das classificações de parâmetros específicos (avaliação destes parâmetros foi realizada com recurso a uma escala não-númerica de intensidade, porém, foi posteriormente convertida numa escala numérica de modo a facilitar a análise). Legenda: — Controlo — K — P — T

É observável na Figura 27A, que, ao contrário do sucedido no estilo *Stout*, a cerveja de controlo foi melhor classificada na maioria dos parâmetros gerais, em detrimento das cervejas co-fermentadas, assumindo o controlo a preferência deste estilo em parâmetros como aroma, *drinkability* e *flavour*. Todavia, o ensaio T e K em menor grau, demonstram boas performances a nível do palato e da aparência, sendo, aliás, a cerveja T superior à de controlo nestes parâmetros: palato (T-3,45, controlo-3,33), aparência (T- 4,2, controlo- 4). O ensaio P, à semelhança do estilo *Stout*, revela pior classificação na maioria dos parâmetros.

Nos atributos mais específicos (Figura 27B), a diferenciação entre os resultados é menor, ainda que apresentando o mesmo padrão verificado no estilo *Stout*: maior percepção de álcool e acidez na cerveja

P, apesar deste evidente padrão de acidez não ser suportado pelos resultados de pH (Tabela 12). A cerveja co-inoculada com estirpe de *K. apiculata* revela menor adstringência e menor acidez (coadunando-se com valor de pH da Tabela 12) e com corpo mais presente, algo não evidenciado na concentrações de açúcares residuais, porém, coadunando-se com o valor final de °brix mais elevado do estilo *Weiss* (6,25), além da concentração final de glicerol desta cerveja (1,76 g.L⁻¹) ser superior às demais analisadas sensorialmente. Nota-se ainda que, em termos de aparência, os atributos claridade e retenção de espuma não detêm a mesma significância em termos da classificação deste parâmetro geral, pois apesar da cerveja P apresentar uma retenção de espuma ideal a sua turbidez excessiva pesou mais no resultado final. A claridade da cerveja aparenta ser o critério mais determinante na aparência da cerveja do estilo *Weiss*, apesar de este estilo ser tradicionalmente túrbido (Strong & England, 2015). Pode-se observar no Anexo IX a influência da co-inoculação no aspecto visual das cervejas.

Em relação ao perfil aromático das cervejas (Anexo VIII, Tabela 33), a menor classificação em termos aromáticos dos ensaios experimentais, reflecte-se igualmente no número de compostos detectados, cuja diferença para o controlo é inexistente ou negativa, tendo sido seleccionados 21 descritores diferentes na cerveja de controlo e uma média de 20 descritores para os restantes ensaios. Porém, a atribuição de diferentes descritores para a caracterização do perfil aromático reforça a premissa da influência clara destas estirpes em termos de composição da fracção aromática da cerveja. Enquanto na cerveja de controlo, os descritores mais comuns incluem “biscoito”, “pão”, “banana” e “mel”, a cerveja K acrescenta “madeira” e “cravinho” ao perfil aromático. A cerveja P evidencia aromas “torrado” e “frutado”, enquanto que o ensaio T, apesar de apresentar descritores mais dispersos, diferencia-se pela referência repetida dos descritores “floral” e “fruta verde”. Constituindo o paralelo com os resultados de GC (Tabela 13), observa-se que os ensaios controlo e P detêm a maior concentração de álcool amílico, podendo-se relacionar com a maior evidência do aroma “banana” destes ensaios detectado pelo painel.

Tabela 14- Avaliação final das cervejas do estilo *Weiss*.

Ensaio	Controlo	K	P	T
Adequação ao estilo (%)*	89	67	44	100
Intenção de compra (0-5)**	3,22±0,97	2,67±1,12	2,44±1,13	3,11±0,93
Classificação geral (0-10)**	6,33±1,32	5,56±1,88	5,11±1,90	6,22±1,92
* Valor percentual do número de provadores que consideraram a cerveja em análise adequada ao estilo.**Valores são médias das classificações do painel de provadores ± desvio-padrão.				

A

intenção de compra e a classificação geral (Tabela 14) reflecte o mesmo cenário de superioridade hedónica do controlo em detrimento das cervejas co-fermentadas. O único ensaio experimental *Weiss* cuja aceitabilidade é semelhante à do controlo é o T, surgindo aliás como a única cerveja *Weiss* em que 100% do painel de provadores considerou adequada ao estilo. Consegue-se concluir através da comparação destes resultados com os homólogos do estilo *Stout* que a co-inoculação das estirpes não-convencionais não revela a mesma pertinência em todos os estilos de cerveja, verificando-se uma média de classificação geral das cervejas co-inoculadas do estilo *Stout* de 6,52, significativamente superior à do estilo *Weiss* (5,63).

4.4. Estilo *Dunkel*

4.4.1. Evolução dos ensaios fermentativos

4.4.1.1. Evolução da microbiota

A evolução da microbiota representada na Figura 28A, em termos de células totais, espelha a clara influência da temperatura menor de fermentação (12°C) aplicada nestes ensaios. A diferença reside essencialmente na taxa específica de crescimento, sendo que, em termos concentração absoluta de células, tal como esperado, os ensaios atingem valores semelhantes aos observados nos mostos *Stout* e *Weiss*: cerca de $1,0 \times 10^8$ cel.mL⁻¹. O desenvolvimento microbiano é expectavelmente mais lento, tendo em conta que a temperatura óptima das leveduras seleccionadas, com excepção da estirpe *S. pastorianus* LB, situa-se entre 25 e 30°C (Kurtzman *et al.*, 2010). No entanto, a espécie *T. delbrueckii* é considerada criotolerante (Alves-Araújo *et al.*, 2007) e o estudo conduzido por (Erten, 2002) referiu o crescimento rápido e maior concentração de biomassa da espécie *K. apiculata* a temperaturas 10-15°C em detrimento de temperaturas superiores. Assim sendo, a susceptibilidade à temperatura inferior deverá ser mais notória nos ensaios DL, DS e P.

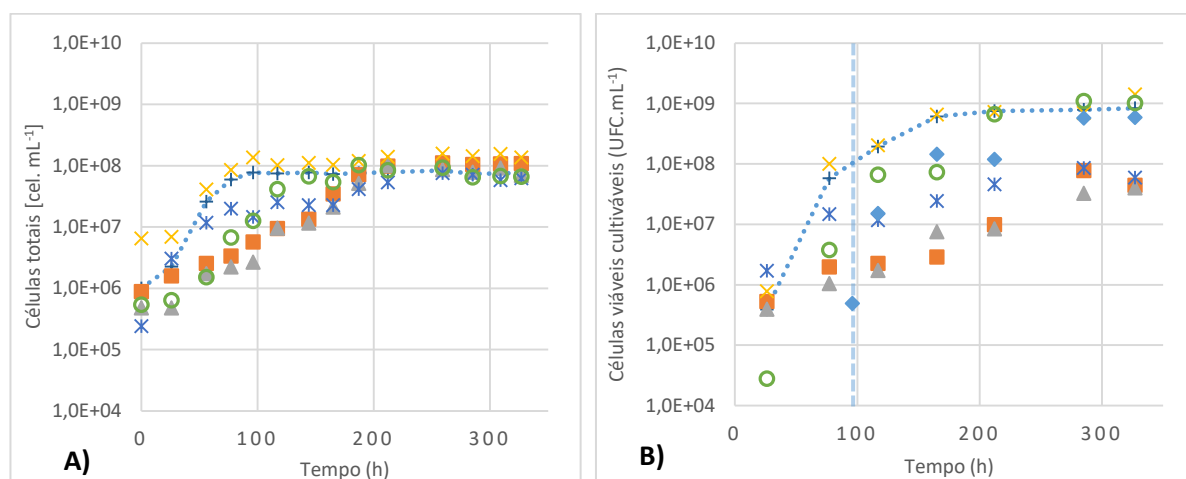


Figura 28- Curvas de crescimento das leveduras durante fermentações co-inoculadas e de controlo (mosto *Dunkel*). A- Evolução da concentração de células totais. B – Evolução da concentração de células viáveis cultiváveis. Os valores apresentados no gráfico B da estirpe LB (co-inóculo) resultam da média de valores observados em cada ensaio co-fermentado. Os valores do ensaio T no gráfico B correspondem a células viáveis cultiváveis totais, ou seja, estirpe T + LB. Linha vertical tracejada simboliza momento da inoculação da estirpe comercial BB nos ensaios co-fermentados.

Símbolos: (+) Controlo; (◆) Co-inóculo LB; (■) DL; (▲) DS; (×) K; (✱) P; (○) T.

Os ensaios controlo e K atingem a fase estacionária às 100 horas de fermentação à taxa específica de crescimento de $0,081 \text{ h}^{-1}$ e $0,059 \text{ h}^{-1}$. No caso do ensaio P é notório um crescimento diaúxico, observando-se que a fase exponencial ($\mu=0,069 \text{ h}^{-1}$) é interrompida por uma fase de latência às 77 horas, somente atingindo um número de células totais na ordem de grandeza dos demais ensaios (cerca de 8×10^7 cel.mL⁻¹) após 260 h de fermentação. O ensaio T, atinge a fase estacionária mais precocemente, às 144 horas, e a uma taxa específica de crescimento de $0,050 \text{ h}^{-1}$, a mais elevada dos ensaios co-inoculados com estirpes não-*Saccharomyces*. Os ensaios DL e DS revelam um

comportamento semelhante, entrando ambos na fase estacionária às 212 horas, a taxas específicas de crescimento similares: 0,022 e 0,029 h⁻¹, respectivamente. Verifica-se ainda nos ensaios DS, K e T uma fase inicial de adaptação às condições de fermentação durante as primeiras 24 horas.

Em relação à variação do número de células viáveis cultiváveis dos ensaios fermentativos, representada na Figura 28B, observa-se que a co-inoculação da estirpe LB não interfere com o crescimento das restantes estirpes de forma significativa. O momento de co-inoculação dá-se às 96 horas de fermentação, sendo que a estirpe LB atinge um valor de células viáveis cultiváveis superior às demais leveduras não-convencionais volvidas 72 horas, exceptuando no ensaio K. A estirpe LB, mesmo assumindo-se como levedura predominante na maioria dos ensaios não afecta significativamente o crescimento das outras estirpes, uma vez que a evolução das células viáveis cultiváveis das demais estirpes é crescente até ao fim da fermentação. Verifica-se somente uma ligeira estabilização da capacidade de multiplicação de algumas das estirpes não-convencionais (especificamente P e DL) entre 24 e 48 horas após co-inoculação, coadunando-se com a fase latência observada para o ensaio P na Figura 28A. A menor capacidade de inibição de leveduras competidoras por parte desta estirpe de *S. pastorianus* é evidente pela elevada concentração de células com capacidade reprodutiva final dos ensaios co-fermentados: cerca 5,0x10⁷ cel.mL⁻¹ nos ensaios P, DL e DS e 1,0x10⁹ cel.mL⁻¹ nos ensaios K e T. Este resultado poderá ser reflexo do efeito conjugado da menor temperatura e menor concentração de etanol já observado em fermentações vinárias (Viana *et al.*, 2012), que poderá ainda ser reforçado pela menor acção anti-microbiana de péptidos produzidos por *Saccharomyces* em presença de menores concentrações de etanol (P. Branco, Comunicação pessoal).

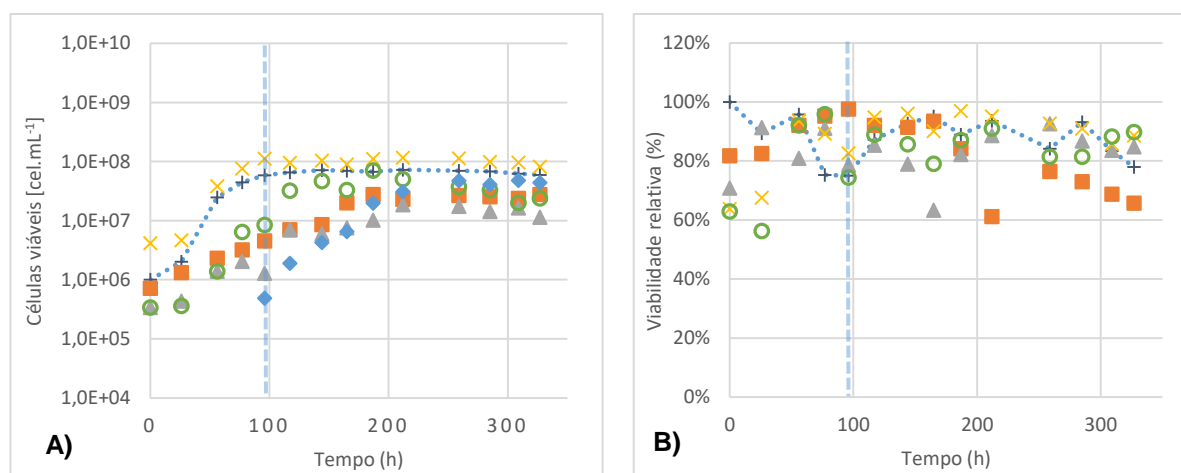


Figura 29- Evolução da viabilidade nos ensaios fermentativos em mosto Dunkel. A) Evolução da concentração de células viáveis. Os valores apresentados no gráfico A da estirpe LB (co-inóculo) resultam da média de valores observados em cada ensaio co-fermentado; B) Evolução da viabilidade relativa (vr= cel.viáveis/cel.totais). Linha vertical tracejada simboliza momento da inoculação da estirpe comercial LB nos ensaios co-fermentados. **Símbolos:** (—+) Controlo; (◆) Co-inóculo LB; (■) DL; (▲) DS; (×) K; (✱) P; (○) T.

A Figura 29A, representativa da evolução dos ensaios *Dunkel* em termos de concentração de células viáveis, espelha um cenário quase idêntico às figuras anteriores (Figura 28A e 28B). Observa-se que a estirpe comercial LB consegue sobrepôr-se às demais estirpes selvagens em termos de número de células viáveis, exceptuando a estirpe de *K. apiculata*. No entanto, a estirpe LB só atinge uma concentração de células viáveis dominante às 260 horas. Tendo em conta os resultados da Figura 29A,

a influência da sua co-inoculação é quase nula, pois em termos numéricos o valor de concentração de células viáveis pouco se altera nos ensaios co-fermentados. É observável, no entanto, uma ligeira diminuição do número de células viáveis das estirpes T e DS, a partir das 187 e 212 horas, respectivamente. Todavia, a concentração de células viáveis final é elevada em todos os ensaios, situando-se entre $1,15 \times 10^7$ cel.mL⁻¹ (DS) e $8,21 \times 10^7$ cel.mL⁻¹ (K), destacando-se este último ensaio pelo domínio total da estirpe *K. apiculata* durante todo o processo fermentativo.

Tendo em conta os resultados apresentados na Figura 29B, verifica-se que a viabilidade relativa ao longo do processo fermentativo se mantém nos vários ensaios, reflectindo o fraco impacto da co-inoculação na evolução da % de células viáveis das estirpes não-convencionais. No caso do ensaio DL, a fermentação termina com menor valor de viabilidade do grupo (66%). A viabilidade relativa dos ensaios, em traços gerais, apesar de apresentar ligeiras flutuações no decorrer da fermentação permanece elevada, inferindo pouca ou nenhuma influência do co-inóculo comercial.

Tabela 15 - Viabilidade relativa inicial e final dos ensaios co-fermentados (mosto *Dunkel*)

Ensaio	DL			DS			K			P			T		
Levedura	DL	LB	Total	DS	LB	Total	K	LB	Total	P	LB	Total	T	LB	Total
Inicial	82%	47%	-	71%	47%	-	64%	47%	-	58%	47%	-	63%	47%	-
Final	69%	96%	84%	82%	89%	87%	87%	79%	85%	-	-	79%	91%	99%	95%

Segundo a Tabela 15, observa-se que a fraca viabilidade do co-inóculo poderá justificar parcialmente a menor sobreposição desta levedura comercial nos ensaios co-fermentados. Como já foi observado nas Figuras 28A e 28B, o ensaio P aparenta ser o mais influenciado pela presença da estirpe comercial, hipótese suportada pelo que o menor valor final de viabilidade relativa (79%), que não pode ser directamente correlacionada com a menor viabilidade inicial. Observa-se, por fim, que nos ensaios do mosto *Dunkel* a viabilidade se manteve constante até o final da fermentação, apresentando uma elevada percentagem de células viáveis de ambas as estirpes (comercial e não-comercial).

4.4.1.2. Evolução físico-química

A evolução dos perfis de consumos de açúcar e produção de etanol e glicerol dos ensaios em mosto *Dunkel* (Figura 30), tal como no caso dos perfis de crescimento microbiológico reflecte a menor temperatura do ensaio, tendo em conta que estes ensaios foram conduzidos a uma temperatura de 12°C, significativamente inferior à temperatura óptima de crescimento das estirpes não-comerciais utilizadas (25-30°C) (Kurtzman *et al.*, 2010). Os ensaios realizados, de forma geral, atingem concentrações de maltose e glucose finais pouco distintas dos homólogos dos estilos *Weiss* e *Stout*, à excepção do ensaio T. No caso da maltotriose, a sua concentração final é claramente superior, o que atendendo a que as espécies de *S. pastorianus* são caracterizadas pela melhor utilização de maltotriose em detrimento da espécie *S. cerevisiae* (Walker & Stewart, 2016) leva a colocar a hipótese de a fermentação ter sido interrompida prematuramente.

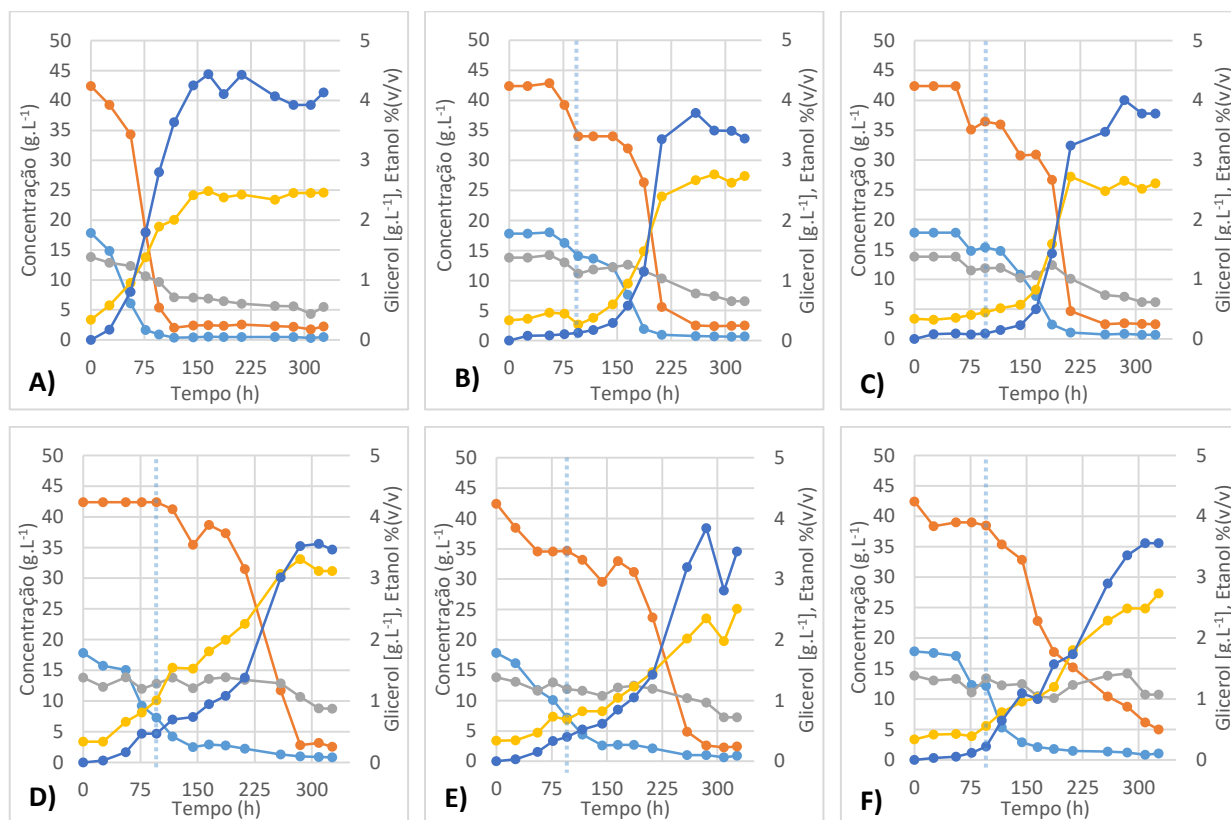


Figura 30- Consumo de açúcares e produção de glicerol e etanol nos ensaios de mosto Dunkel. A) Ensaio de controlo; B) Ensaio co-fermentado com *D. bruxellensis* DL; C) Ensaio co-fermentado com *D. bruxellensis* DS; D) Ensaio co-fermentado com *K. apiculata*; E) Ensaio co-fermentado com *S. cerevisiae* P; F) Ensaio co-fermentado com *T. delbrueckii*. Linha vertical tracejada simboliza momento da inoculação da estirpe comercial *S. pastorianus* LB nos ensaios co-fermentados. Legenda: — GLUCOSE — MALTOSE — MALTOTRIOSE — GLICEROL — ETANOL

Em relação ao domínio da estirpe comercial LB, como se observa na Figura 30 e em concordância com os resultados já apresentados para a viabilidade (Figura 29A), este não foi tão evidente como nos ensaios anteriores, levando a um menor consumo do substrato. A temperatura a que decorreram os ensaios teve uma clara influência na produção de glicerol, sendo que este poliól, além de ser produzido em resposta a stress de pressão osmótica (Nevoigt e Stahl, 1997), também desempenha eficazmente funções de crioproteção celular (Lewis *et al.*, 1993). Atinge-se, nestes ensaios, concentrações superiores a 2,5 g.L⁻¹, significativamente mais elevadas que as observadas nos ensaios anteriores conduzidos a uma temperatura de 25°C (média=1,60 e 1,95 g.L⁻¹, estilos *Weiss* e *Stout*, respectivamente).

A superioridade da estirpe comercial em detrimento das demais estirpes não-comerciais é evidente no que diz respeito à adaptação ao substrato, velocidade de consumo de açúcares (0,39 g.L⁻¹.h⁻¹) e rendimento em etanol (0,55 g.g⁻¹). Observa-se para a estirpe comercial, após inoculação, um consumo imediato e simultâneo de glucose, maltose e maltotriose, sendo aliás, a única estirpe a exibir este tipo de assimilação, evidenciando pouca repressão catabólica por parte da glucose e maltose nesta estirpe. O ensaio de controlo completa a fermentação por volta das 150 horas, momento a partir do qual o consumo de fonte de carbono e consequente produção de etanol e glicerol estabiliza. Nos ensaios co-inoculados com estirpes de *D. bruxellensis* (DL e DS), o impacto da temperatura reflecte-se não só no

prolongamento da fase de adaptação (*lag*) de ambos os ensaios, iniciando a fermentação somente 56 horas após inoculação, como na velocidade de consumo de açúcares: $0,20 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em ambos os ensaios. Seguramente mais prolongada que a do ensaio de controlo, a fermentação nestes ensaios, no entanto, consegue simultaneamente reduzir os níveis de maltose e glucose a concentrações residuais e atingir um rendimento em etanol semelhante ao controlo: $0,41 \text{ g.g}^{-1}(\text{DL})$ e $0,46 \text{ g.g}^{-1}(\text{DS})$.

A estirpe de *K. apiculata* revela uma boa adaptação à temperatura inferior de fermentação, com consumo imediato de glucose e rendimento elevado em etanol ($0,48 \text{ g.g}^{-1}$) e glicerol ($0,12 \text{ g.g}^{-1}$) nas primeiras 96 horas. Observa-se portanto, bom desempenho fermentativo desta espécie mesmo a temperaturas inferiores ($10\text{-}15^{\circ}\text{C}$), característica já evidenciada nos estudos conduzidos por (Bilbao *et al.*, 1997; Erten, 2002). O ensaio com espécie *S.cerevisiae* não-comercial também exibe boa resistência a temperaturas baixas, sem distinção de fase *lag* no consumo de açúcares, porém a sinergia com a espécie comercial *S. pastorianus* não é tão vantajosa, como observado nos estilos anteriores, finalizando o ensaio com um rendimento em etanol de $0,44 \text{ g.g}^{-1}$, inferior ao de controlo. No ensaio P, além das concentrações finais de etanol e glicerol serem das mais baixas do grupo, verifica-se fraco consumo de maltotriose: somente 46%. O ensaio T, apresenta uma fase *lag* prolongada, ocorrendo fraca assimilação de açúcares, apenas de $0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, até o momento de inoculação da estirpe comercial. O consumo de maltose neste ensaio é realizado a ritmo muito baixo ($0,12 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), o que, tendo em conta a repressão deste dissacarido sobre o consumo e metabolismo de maltotriose, fundamenta a concentração elevada de maltotriose no final do ensaio ($10,72 \text{ g.L}^{-1}$), praticamente inalterada. Deve-se salientar que, contrariamente ao verificado nos mostos *Stout* e *Weiss*, a concentração final de açúcares deste ensaio *Dunkel T*, é bastante superior, adivinhando-se alguma interação negativa entre as espécies *T. delbrueckii* e *S.pastorianus*. Apesar da viabilidade da co-cultura ser elevada durante todo o ensaio, não se traduziu numa completa assimilação e fermentação dos açúcares ao contrário do que foi observado para o controlo.

4.4.2. Produto final

4.4.2.1. Perfil físico-químico

A caracterização físico-química das cervejas do estilo *Dunkel* (Tabela 16), em termos de relevância estatística espelha um cenário claramente mais diferenciado, observando-se diferenças significativas em várias determinações.

Tabela 16- Principais características analíticas das cervejas de controlo e co-fermentadas no mosto *Dunkel*.

Ensaio	Controlo	DL	DS	K	P	T
Açúcares residuais (g.L⁻¹)*	7,23±0,61 ^c	11,64±0,32 ^{ab}	9,12±0,14 ^{bc}	12,35±0,21 ^{ab}	10,97±0,11 ^{bc}	15,19±0,54 ^a
°Brix	5,5±0 ^a	5,5±0,28 ^a	5,75±0,92 ^a	6±0,42 ^a	5,7±0,42 ^a	6,35±0,21 ^a
Glicerol (g.L⁻¹)	2,55±0,38 ^{ab}	3,27±0,47 ^a	2,43±0,07 ^{ab}	3,14±0,06 ^{ab}	2,24±0,02 ^b	2,52±0,07 ^{ab}
Etanol %(v/v)	4,5±0,03 ^a	3,36±1,43 ^a	3,25±0,75 ^a	2,84±1,12 ^a	3,61±0,16 ^a	3,36±0,25 ^a
pH	4,43±0,2 ^a	4,30±0,17 ^a	4,41±0,02 ^a	4,08±0,24 ^a	4,38±0,17 ^a	4,42±0,09 ^a
Ácido acético (mg.L⁻¹)	251,07±57,3 ^{2b}	522,39±12,23 ^a _b	295,71±142,5 ^{3b}	673,09±65,07 ^a	312,21±66,26 ^b	498,01±102,93 ^{ab}
Ácido succínico (mg.L⁻¹)	511,75±272,57 ^a	272,85±37,47 ^a	419,8±165,7 ^a	567,37±27,76 ^a	506,59±67,23 ^a	317,62±70,73 ^a
Ácido málico (mg.L⁻¹)	1579,3±113,32 ^{ab}	1807,5±108,6 ^{2ab}	1635,1±87,55 ^a _b	1933,4±302,4 ^{5a}	1883,7±37,07 ^a _b	1255,1±175,75 ^b
Valores são médias das fermentações realizadas em duplicado para cada ensaio ± desvio-padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha correspondem a valores médios significativamente distintos (p<0,05) *soma das concentrações finais de glucose, maltose e maltotriose.						

A concentração elevada de açúcares residuais das cervejas reflecte a situação acima descrita nas Figuras 29 e 30, em que o menor domínio da estirpe BB nos ensaios co-fermentados resultou na incompleta assimilação de açúcares do mosto (atenuação média de 85% neste estilo face a 92% (*Stout*) e 93% (*Weiss*)). As concentrações de açúcares residuais reflectem a maior capacidade de assimilação de açúcares das estirpes de *S. cerevisiae* (ensaio P) e *S. pastorianus* (ensaio controlo) em detrimento das restantes não-*Saccharomyces* utilizadas, evidenciado pela diferença significativa observável entre os valores. Os valores mais elevados de concentração de açúcares residuais, e simultaneamente de °brix, pertencem às cervejas K (12,35 g.L⁻¹) e T (15,19 g.L⁻¹), ambas diferindo significativamente do controlo. Realmente, observa-se na Figura 29A, que estes foram os ensaios em que a concentração de células viáveis da levedura comercial BB não conseguiu suplantar a levedura selvagem (ensaio K), ou apenas atingindo concentrações superiores no fim da fermentação (ensaio T), podendo assim justificar a menor atenuação do mosto: 83% e 79%, respectivamente.

Observam-se também diferenças significativas em termos de produção de glicerol, com a estirpe DL a ser responsável pelo ensaio com maior concentração (3,27 g.L⁻¹), distinguindo-se significativamente do ensaio P (2,24 g.L⁻¹). De forma geral, os ensaios co-fermentados com estirpes não-*Saccharomyces* apresentam valores substancialmente superiores àqueles fermentados exclusivamente com estirpes *Saccharomyces*. De realçar ainda a diferença clara, porém não significativa, entre as estirpes de *D. bruxellensis*, não observada nos estilos *Stout* e *Weiss*, bem como a elevada concentração de glicerol

do ensaio K (3,14 g.L⁻¹), reforçando a produção acrescida deste poliól característica da espécie *K. apiculata* (Díaz-Montañó *et al.*, 2008).

O conteúdo de etanol das cervejas não difere significativamente entre os ensaios e devido à menor atenuação do mosto, observa-se valores possivelmente demasiado baixos para o estilo de cerveja nos ensaios co-fermentados, todos eles abaixo de 4% de etanol (v/v). Tendo em conta que o estilo *Dunkel* prevê um teor alcoólico compreendido entre 4,5-5,6% (Strong & England, 2015), verifica-se, portanto, que apenas o ensaio de controlo atingiu uma concentração de etanol adequada ao estilo. O facto de a fermentação poder ter sido interrompida prematuramente poderá estar na origem dos menores valores obtidos. No entanto, a concentração de etanol estabiliza muito antes da interrupção da fermentação o que leva a considerar que poderão ter existido outros factores que justifiquem estes valores.

Em relação ao valor de pH, apesar dos ensaios não diferirem significativamente, observa-se que a cerveja do ensaio K é claramente a mais ácida do grupo (4,08), com os demais ensaios deste estilo a apresentarem valores muito semelhantes entre si. A cerveja co-fermentada com a estirpe de *K. apiculata* destaca-se igualmente pela concentração dos ácidos orgânicos detectados, significativamente superior à maioria dos outros ensaios (incluindo controlo). Paralelamente, o ensaio T revela as menores concentrações de ácido succínico e málico, padrão que se coaduna com os resultados anteriormente analisados nos estilos *Stout* e *Weiss*, e com os estudos de (Loira *et al.*, 2014; Sosa *et al.*, 2008).

4.4.2.2. Perfil aromático

Os resultados do perfil aromático das cervejas do estilo *Dunkel* apresentam uma distinção mais evidente e estatisticamente relevante entre os ensaios (Tabela 17).

Tabela 17- Concentração de compostos voláteis presentes nas cervejas do estilo *Dunkel* (mg.L⁻¹), determinação por GC-FID.

Ensaio	Controlo	DL	DS	K	P	T
2- Fenil etanol	67,34±3,53 ^a	49,70±5,40 ^{ab}	53,97±11,47 ^{ab}	42,94±0,63 ^b	46,52±2,05 ^{ab}	40,47±1,12 ^b
2,3- Butanediol	16,67±2,30 ^b	16,15±1,91 ^b	17,14±3,23 ^b	27,22±1,59 ^a	19,81±1,72 ^{ab}	21,03±0,11 ^{ab}
Alcool amílico	66,78±10,05 ^a	26,80±16,47 ^b	44,00±11,15 ^{ab}	19,79±4,52 ^b	26,57±7,00 ^b	10,82±4,33 ^b
4- Etil guaiacol	8,14±0,06 ^a	8,36±0,21 ^a	8,39±0,05 ^a	7,98±0,12 ^a	8,03±0,14 ^a	8,09±0,20 ^a
Nº compostos*	21,5±2,12 ^a	17,0±7,07 ^a	20,5±4,95 ^a	23,0±0,00 ^a	22,5±2,12 ^a	24,0±1,41 ^a
Valores são médias das fermentações realizadas em duplicado para cada ensaio ± desvio-padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha correspondem a valores médios significativamente distintos (p<0,05). * número absoluto de compostos detectado por GC-FID.						

Em relação ao primeiro composto volátil, verifica-se a concentração significativamente superior de 2-feniletanol na cerveja de controlo em relação aos ensaios co-fermentados K e T, contrariando os resultados observados por (Tataridis *et al.*, 2013) para a estirpe *T. delbrueckii*. Em relação ao composto 2,3- Butanediol, derivado da redução de diacetilo, verifica-se a menor concentração do ensaio de controlo (16,67 mg.L⁻¹) e das estirpes da espécie *D. bruxellensis* (16,15 e 17,14 mg.L⁻¹, DL e DS

respectivamente), assumindo a estirpe *K. apiculata* como a estirpe de maior capacidade de redução de diacetilo deste grupo, com uma concentração de 2,3- Butanediol de 27,22 mg.L⁻¹. Este padrão já foi observado nos ensaios do estilo *Stout*, porém, contraria os resultados deste composto no ensaios *Weiss*.

Em termos de concentração de álcool amílico, a cerveja de controlo assume, novamente, a maior concentração do grupo (66,78 mg.L⁻¹), diferindo significativamente dos ensaios co-fermentados. Apesar da homogeneidade estatística dos resultados de concentração do composto fenólico 4- Etil guaiacol, as estirpes *D. bruxellensis* são responsáveis pela co-fermentação de cervejas com maior concentração deste composto. Por fim, o número de compostos detectados no GC-FID revela, em certa medida, a tendência observada da maior complexidade aromática dos ensaios co-fermentados em detrimento do controlo, ainda que estatisticamente não se verifiquem diferenças significativas.

4.4.2.3. Análise sensorial

No estilo *Dunkel*, foram descartadas as cervejas co-fermentadas com estirpes de *D. bruxellensis* (DL e DS) à semelhança do que sucedeu no estilo *Weiss*. A Figura 31A revela que a preferência das cervejas co-inoculadas, em detrimento da cerveja de controlo, é evidente em todas as categorias genéricas.

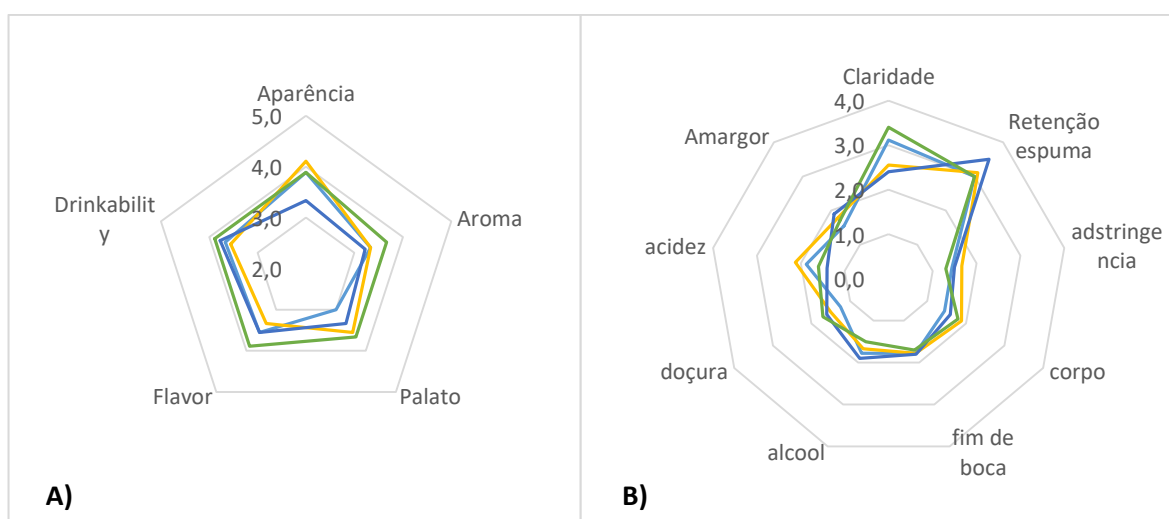


Figura 31- Resultados análise sensorial cervejas Dunkel. A) Gráfico rede das classificações dos parâmetros gerais; B) Gráfico rede das classificações de parâmetros específicos (avaliação destes parâmetros foi realizada com recurso a uma escala não-númerica de intensidade, porém foi posteriormente convertida numa escala numérica de modo a facilitar a análise). Legenda: — Controlo — K — P — T

Verifica-se que à semelhança do estilo *Stout*, a cerveja co-fermentada com estirpe T obteve melhor classificação em termos de aroma (3,67), palato (3,67), *flavour* (3,89) e *drinkability* (3,89). A cerveja K revela a melhor classificação em termos de aparência (4,11), sendo igualmente apreciada em termos aromáticos (3,56) e de palato (3,56). A cerveja P, por outro lado, dentro das cervejas co-fermentadas revela menor apreciação a nível da aparência (3,33) e aroma (3,22), porém superior à cerveja de controlo nos restantes atributos. Verifica-se que a análise sensorial tendo em conta estes parâmetros gerais, assume o palato como o critério mais diferenciador entre a cerveja de controlo e as co-inoculadas (Figura 31A), podendo estar relacionado como facto de várias determinações do perfil físico-químico terem revelado diferenças estatisticamente significativas entre os ensaios (Tabela 16).

Nos atributos mais específicos presentes no gráfico da Figura 31B, observa-se um cenário contraditório aos demais estilos de cerveja anteriormente analisados. Os atributos adstringência e acidez, cuja percepção nos restantes estilos foi mais intensa no ensaio P, neste caso verificou-se que foi o ensaio K a ser caracterizado como mais ácido e adstringente estes valores mais elevados, comprometendo assim a *drinkability* da cerveja e em grande medida o *flavour* da mesma. Realmente o ensaio K, como já foi discutido, apresentou no mosto *Dunkel* o menor pH do grupo (4,08). Em termos de corpo e doçura, mantém-se o padrão observado na Tabela 16, do maior esgotamento do substrato dos ensaios de controlo e P, traduzindo-se em cervejas com corpo mais leve. As cervejas K e T, por outro lado, foram caracterizadas como tendo um corpo mais robusto e com maior percepção de doçura, algo evidenciado simultaneamente pelos valores superiores de açúcares residuais (12,35 e 15,19 g.L⁻¹) e concentração de glicerol destes ensaios (3,14 e 2,52 g.L⁻¹). Como foi indicado nos resultados do perfil físico-químico (Tabela 16), o volume de álcool produzido pouco difere entre os ensaios co-fermentados, e estes, por sua vez, revelam um volume de etanol abaixo do esperado para este estilo. Porém, em termos sensoriais, a cerveja de controlo, única com volume de etanol acima do limite mínimo 4,5 % (v/v), não é percebida como a mais alcoólica. Por outro lado, o baixo teor alcoólico das cervejas K e T, não aparenta ser considerado um atributo marcadamente negativo, uma vez que nos parâmetros gerais de sabor (palato e *flavour*), estas obtiveram melhor classificação que o controlo. As diferenças no atributo de claridade podem ser observados no anexo IX.

A capacidade superior das leveduras não-convencionais de produção de compostos voláteis é apoiada pelos resultados da Tabela 34 presente no Anexo VIII. Nesta tabela evidencia-se a superioridade numérica dos descritores assinalados nas cervejas co-inoculadas em relação à cerveja de controlo, sendo a cerveja T aquela cuja fracção aromática é marcadamente mais complexa, algo já observado no estilo *Stout*. O perfil aromático das cervejas percebido pelo painel encontra-se igualmente no anexo VIII, onde figuram os descritores mais assinalados para cada ensaio. Os descritores mais recorrentes para cerveja *dunkel* de controlo foram “caramelo”, “frutado”, “biscoito” e “toffee”, enquanto na cerveja K, os provadores identificaram ainda aromas remanescentes a “café”, “citrinos” e “fruta verde”. A cerveja P é aquela que mais descritores distintos foram seleccionados pelo painel para descrever o perfil aromático, incluindo além dos já mencionados, “mel”, “nozes”, “queijo” e “medicinal”, conseguindo-se perceber pela combinação de aromas a menor classificação atribuída (3,22), uma vez que inclui alguns aromas pouco apelativos. Por fim a cerveja T, melhor classificada neste estilo, descritores como “floral”, “herbáceo”, “fumado” e “cravinho” são os que mais enfatizam a sua distinção face ao controlo.

Tabela 18- Avaliação final das cervejas do estilo Dunkel.

Ensaio	Controlo	K	P	T
Adequação ao estilo (%)*	89	78	89	100
Intenção de compra (0-5)**	3,33±0,71	3,44±1,24	3,56±0,88	3,78±1,30
Classificação geral (0-10)**	6,33±0,87	6,67±2,00	6,72±1,89	7,44±1,24
*Valor percentual do número de provadores que consideraram a cerveja em análise adequada ao estilo. **Valores são médias das classificações do painel de provadores ± desvio-padrão.				

Em relação à classificação e subsequente intenção de compra sintetizadas na Tabela 18, confirma-se a preferência das cervejas co-inoculadas em detrimento da cerveja de controlo, expressa tanto na classificação geral como na intenção de compra. A adequação ao estilo, de forma geral, é igualmente bastante positiva, com um valor médio a rondar os 90% de afirmação positiva nas cervejas co-inoculadas. Às vezes, à semelhança do estilo *Weiss*, o mosto co-fermentado com *T. delbrueckii* produziu uma cerveja plenamente adequada ao estilo, superando a cerveja de controlo, fermentada exclusivamente com a estirpe comercial LB.

4.5. Discussão geral

Foi pretendido com este trabalho testar o potencial de leveduras não-convencionais na fermentação de vários estilos de cerveja, tendo em vista o enaltecimento do perfil sensorial. Verificou-se, através da análise físico-química e sensorial, que a co-fermentação utilizando leveduras não-convencionais beneficiou o perfil sensorial dos estilos *Stout*, *Weiss* e *Dunkel* de forma diferenciada, havendo combinações de estirpes e estilos de cerveja mais promissoras que outras. A Tabela 35 (Anexo X) apresenta um resumo dos resultados obtidos nas principais determinações dos ensaios co-fermentativos.

Estirpes de leveduras

No caso das estirpes de *D. bruxellensis*, apesar de revelarem uma taxa específica de crescimento inferior às outras estirpes das espécies de leveduras selecionadas (*S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *K. apiculata* e *T. delbrueckii*), os ensaios fermentativos atingiram concentrações de etanol moderadas para ambas as estirpes, e concentrações de glicerol superiores ao controlo. Observou-se ainda um incremento na concentração de ácido acético na cerveja final em detrimento do controlo, não ocorrendo grande variação nos restantes ácidos orgânicos quantificados. Em termos sensoriais, a cerveja *Stout* co-fermentada com a estirpe DL apresentou uma melhoria sensorial face ao controlo, tanto em termos de aroma como *flavour*, resultando numa classificação geral mais elevada e numa apreciação mais positiva. Por outro lado, a estirpe DS aparenta ser menos apropriada para a co-fermentação deste estilo de cerveja uma vez que a cerveja *Stout* co-fermentada por esta estirpe não se diferencia de forma evidente do controlo. A co-fermentação nos estilos de cerveja *Weiss* e *Dunkel* com estirpes de *D. bruxellensis* não favoreceu o perfil sensorial do produto final, resultando em cervejas sensorialmente desagradáveis, devido à evidente intensidade de *off-flavours*. O número de células metabolicamente activas de ambas as estirpes de *D. bruxellensis* ao longo dos ensaios fermentativos é constante em todos os estilos de cerveja, entre 1×10^7 cel.mL⁻¹ e 1×10^8 cel.mL⁻¹ (Anexo VII) não se podendo relacionar a concentração celular com a disparidade das características organolépticas observadas entre os estilos de cerveja. A maior quantidade de maltes torrados do estilo *Stout* e portanto maior complexidade de precursores de aroma e *flavour*, decorrentes essencialmente de reacções de *Maillard* durante a torra do malte (Coghe *et al.*, 2005), poderá ser responsável pelo resultado final mais interessante neste estilo. Entre as duas estirpes de *D. bruxellensis* utilizadas, os resultados apontam uma vantagem na utilização da estirpe DL, uma vez que, além do maior rendimento em etanol (0,526 g.g⁻¹) em detrimento

da estirpe DS (0,380 g.g⁻¹), os principais atributos na análise sensorial obtiveram melhor classificação na cerveja *Stout* co-inoculada com DL.

Apesar de já existir bibliografia que refere que esta espécie desempenha um papel fundamental na fermentação da cerveja do estilo *Lambic* e *Gueuze*, a utilização de *Dekkera bruxellensis* revela que nem todos os estilos de cerveja se adaptam bem às suas características fenotípicas. Além disso, a inoculação inicial só com de *D. bruxellensis* em mosto de cerveja não é comum, pois nos estilos de cerveja *Lambic* e *Gueuze*, *Dekkera/Brettanomyces* apenas surge em momentos tardios/finais da fermentação do mosto (Van Oevelen *et al.*, 1977).

Em relação à fermentação com *K. apiculata*, apesar desta espécie só ser capaz de fermentar de glucose, o ensaio co-inoculado com estirpes comerciais de *Saccharomyces* apresentou um consumo do substrato eficaz, com rendimento em etanol moderado (4% v/v) e produção acrescida de glicerol (2,26 g.L⁻¹) face aos ensaios de controlo (1,92 g.L⁻¹). Esta estirpe foi igualmente responsável pela produção de ácido acético, succínico e málico superior ao controlo em todos os estilos de cerveja. Em termos sensoriais, as cervejas resultantes foram melhor classificadas face ao controlo nos atributos *drinkability*, *flavour* e palato, distinguindo-se deste pelo corpo mais pleno e equilíbrio de amargor, acidez e doçura, para além de uma maior complexidade aromática. No estilo *Stout*, a cerveja co-inoculada com *K. apiculata* foi descrita como tendo um carácter mais herbáceo e fumado, apreciado pelo painel. Por outro lado, nos estilos *Weiss* e *Dunkel*, o facto do aroma mais complexo, de carácter mais cítrico e frutado, não se traduziu na maior apreciação do aroma. Com excepção do estilo *Weiss*, a adequação ao estilo das cervejas co-inoculadas com *K. apiculata* foi considerada positiva e consensual, sendo que no estilo *Stout*, este ensaio produziu a cerveja mais bem classificada do presente trabalho (7,6). Perante estes resultados, a inclusão de *K. apiculata* na fermentação dos estilos *Stout* e *Dunkel* tem um impacto positivo, favorecendo a cerveja final mais a nível de palato do que em termos aromáticos, em resultado provavelmente da presença de maior concentração de glicerol e de ácidos orgânicos.

Por outro lado, o facto de esta espécie se caracterizar por não consumir o principal açúcar do mosto, maltose, leva a que o processo mais aconselhado seja a co-inoculação com *S. cerevisiae* comercial, a fim de associar às características conferidas por *K. apiculata* a garantia do esgotamento de açúcares e de uma quantidade de etanol adequada.

A co-fermentação de cerveja com a estirpe não-comercial *S. cerevisiae* P, de forma geral, não resultou em cervejas sensorialmente apelativas, sendo que a análise sensorial revelou valores inferiores na maioria dos atributos gerais em relação ao controlo. As fermentações sequenciais levadas a cabo pela combinação das estirpes de *Saccharomyces* revelaram uma sobreatenuação do mosto. As cervejas produzidas revelaram-se excessivamente carbonatadas, com elevada concentração de etanol, de corpo leve e menor *drinkability* nos estilos *Stout* e *Weiss*, em que o consumo de açúcares foi quase absoluto (95%). Nos ensaios co-fermentados P verificou-se acidez perceptivelmente excessiva, porém esta percepção poderá ter sido enaltecida pela menor concentração de açúcares residuais e glicerol, ambas inferiores ao controlo. Em termos aromáticos, detectaram-se vários aromas considerados *off-flavours* como “medicinal”, “solvente”, “queijo”, “vinagre” e “manteiga” resultando na menor apreciação da componente aromática destas cervejas. Apesar dos atributos mencionados se reflectirem na fraca

adequação ao estilo das cervejas *Stout* e *Weiss*, no estilo *Dunkel*, devido à menor actividade da levedura não-comercial *S. cerevisiae*, o impacto negativo no produto final foi minimizado, resultando numa cerveja com características organolépticas mais apelativas que o controlo. É possível que em cervejas de baixa fermentação, as características fenotípicas desta estirpe de *S. cerevisiae* possam contribuir positivamente para o desenvolvimento sensorial.

Os efeitos gerais da co-inoculação da estirpe de *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* são bastante positivos, decorrendo da sua co-fermentação uma pronunciada complexidade sensorial, distinguindo-se do controlo essencialmente a nível aromático. Apesar da menor taxa de crescimento e menor capacidade de assimilação de maltose observada para esta estirpe de levedura, os ensaios co-fermentados com *T. delbrueckii* foram, contudo, caracterizados por um consumo de açúcares acima de 90% nos estilos *Stout* e *Weiss*, e 79% no estilo *Dunkel*, produzindo cervejas com concentração de etanol a rondar os 3,5% (v/v). A co-inoculação desta estirpe teve pouca influência a nível de produção de glicerol ou ácidos orgânicos, obtendo-se concentrações similares ao ensaio de controlo. Ainda assim, o palato, *flavour* e *drinkability* foram enaltecidos pela co-inoculação desta estirpe, reflectindo-se na melhor classificação atribuída nestes parâmetros durante a análise sensorial, em detrimento do controlo. As cervejas co-fermentadas T do estilo *Stout* revelaram um perfil aromático mais floral e adocicado, enquanto que no estilo *Weiss* foram evidenciados aromas mais cítricos e frutados, e no estilo *Dunkel* aromas fenólicos, florais e fumados. Com excepção do estilo *Stout*, as cervejas co-fermentadas com esta levedura revelaram uma plena adequação ao estilo. A particularidade da espécie de *T. delbrueckii* na fermentação de cerveja evidenciada neste trabalho prende-se com o menor teor alcoólico atingindo, sem, no entanto, comprometer o perfil sensorial. Tendo em conta que o consumidor actual se encontra mais consciente do impacto negativo do álcool, cervejas com baixa teor alcoólico têm procura crescente (Strejc *et al.* 2013), revelando esta espécie de levedura aplicação neste segmento.

Metodologias aplicadas

Relativamente ao meio selectivo utilizado, apesar de eficaz para a detecção das estirpes não-convencionais utilizadas, simultaneamente inibindo as leveduras comerciais, o meio YPD + cicloheximida [10mg.L⁻¹] impediu a detecção de *T. delbrueckii*. Alternativamente pode-se utilizar o meio MYGP suplementado com CuSO₄ [195 mg.L⁻¹] que segundo (van der Kühle & Jespersen, 1998) permitiu a detecção de um maior número de leveduras não-comerciais *saccharomyces* e não-*Saccharomyces* comparativamente a outros meios selectivos existentes, nomeadamente LM, WLN e UBA + cicloheximida. Para a detecção da espécie *T. delbrueckii*, ainda se pode aplicar uma temperatura de incubação mais elevada como ferramenta de diferenciação entre esta levedura e as leveduras comerciais *Saccharomyces*. Segundo (Loira *et al.*, 2014) a incubação de placas de meio YPD com co-culturas de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* a 25°C e 39°C possibilita a crescimento isolado das duas espécies de levedura, atendendo que a estirpe utilizada de *T. delbrueckii* não exibiu crescimento a 39°C e *S. cerevisiae* sim. Porém, seria necessário testar previamente a temperatura máxima de crescimento das estirpes de leveduras utilizadas de modo a avaliar a possibilidade de utilização deste método de contagem de estirpes selectivas dentro da mesma amostra.

O problema essencial da selecção de meios selectivos reside na exibição de comportamentos específicos consoante a estirpe levedura, sendo que o meio selectivo forçosamente terá que ser adaptado consoante as leveduras utilizadas, ainda sendo necessário a utilização de dois tipos de meios de crescimento (selectivo e não-selectivo) para avaliar a capacidade reprodutiva de culturas co-inoculadas.

Relativamente à metodologia empregue de HPLC, como já foi mencionado na discussão específica dos estilos de cerveja, observou-se que a nível físico-químico a distinção entre os ensaios foi muito pontual, observando-se maior distinção somente no caso do estilo *Dunkel*. Os ensaios fermentativos dos estilos *Stout* e *Weiss* desenrolaram-se de forma similar, finalizando a fermentação com níveis de açúcares, etanol e glicerol sem diferenças significativas. Para além disso, dado o maior desvio-padrão associado aos valores médios de ácidos orgânicos destes ensaios, não se verificou diferenças estatisticamente significativas. Por outro lado, no caso do ensaio *Dunkel*, verificou-se que o desvio-padrão associado às médias da concentração de ácidos orgânicos é claramente inferior aos restantes estilos, revelando de forma mais definitiva a distinção entre os ensaios.

Tendo a conta a Tabela 19, as concentrações aferidas encontram-se muito acima do padrão esperado para a cerveja, devido às limitações discutidas no ponto 4.1.4. A quantificação eficaz destes compostos por HPLC seria possível com a adaptação das condições de corrida, em termos de temperatura, fluxo e/ou mudança de eluente de modo a possibilitar o isolamento mais definido dos compostos de interesse no cromatograma.

Tabela 19- Limite de detecção e concentração típica em cerveja de compostos voláteis e não-voláteis. Concentrações expressas em mg.L⁻¹. Adaptado de: (Engan 1972; Engan 1974; Morton C. Meilgaard 1975; Klopfer *et al.* 1986; Briggs *et al.* 2004)

Compostos	Limite de detecção	Concentração típica em cerveja
Ácido acético	90-175	100-280
Ácido succínico	200	40-160
Ácido málico	350	50-100
Glicerol	-	500-4000
2- Fenil etanol	40-100	20-55
2,3- Butanediol	4500	40-280
4- Etil guaiacol	-	-
Álcool amílico	50-100	5-35

Em relação aos resultados de cromatografia gasosa, estes revelaram, acima de tudo, a ineficácia do método de extracção aplicado. Foi observado nos cromatogramas de GC que, além da sobreposição de picos de compostos aromáticos pela fraca distinção entre tempos de retenção, ocorreu igualmente a detecção de poucos compostos voláteis. Em substituição da extração líquida seria mais eficaz recorrer a *headspace*, por si só ou em combinação com outras metodologias, de forma a assegurar a extracção completa da fracção aromática da cerveja. Segundo (Saison *et al.*, 2008) a extracção líquida com recurso a diclorometano, aplicada no presente trabalho, possibilitou a extracção de apenas um

terço dos compostos detectados na extracção com recurso a SPME em combinação com *headspace*. A quantificação dos compostos detectados, por outro lado, encontra-se de acordo com a bibliografia, estando os valores aferidos neste trabalho dentro das concentrações típicas em cerveja (Tabela 19).

Reprodutibilidade dos ensaios

No perfil físico-químico das cervejas produzidas do estilo *Stout*, *Weiss* e *Dunkel*, observou-se um desvio-padrão elevado associado aos valores médios das réplicas dos ensaios, mais acentuado para os ácidos orgânicos. Porém, uma vez que somente no caso dos ácidos orgânicos é que o desvio-padrão associado é considerável, os restantes resultados, tanto a nível físico-químico como microbiológico, abonam a favor da reprodutibilidade destes ensaios. Observou-se padrões de evolução microbiota muito semelhantes entre as réplicas e características analíticas gerais igualmente similares. Na Tabela 20 consta a concentração celular e viabilidade dos inóculos dos ensaios. Apesar da ocorrência de alguma variação na concentração e viabilidade dos inóculos utilizados, não se verificaram consequências significativas decorrentes deste facto.

Tabela 20- Concentração celular e viabilidade dos inóculos nos ensaios fermentativos

Levedura		<i>Stout</i>	<i>Weiss</i>	<i>Dunkel</i>
Controlo	[células.mL ⁻¹]	9,6x10⁵±3,68x10⁵	9,54x10⁵±1,61x10⁵	2,36.10⁶±2,31x10⁶
	Viabilidade (%)	91±13	56±52	96±5
DL	[células.mL ⁻¹]	1,16x10⁶±1,44x10⁶	2,76x10⁶±3,34x10⁶	7,9x10⁵±1,27x10⁵
	Viabilidade (%)	85±18	94±2	84±3
DS	[células.mL ⁻¹]	1,15x10⁶±1,48x10⁶	2,82x10⁶±3,45x10⁶	2,8x10⁵±2,83x10⁵
	Viabilidade (%)	88±3	86±3	60±15
K	[células.mL ⁻¹]	3,49x10⁶±1,68x10⁶	2,17x10⁷±2,79x10⁷	5,45x10⁶±1,51x10⁶
	Viabilidade (%)	88±1	97±4	63±1
P	[células.mL ⁻¹]	7,45x10⁵±8,27x10⁵	2,26x10⁶±2,94x10⁶	6,0x10⁵±5,09x10⁵
	Viabilidade (%)	100±0	74±11	77±27
T	[células.mL ⁻¹]	7,85x10⁵±6,86x10⁵	3,19x10⁶±4,17x10⁶	7,4x10⁵±2,83x10⁵
	Viabilidade (%)	77±15	81±8	69±8
Co-inóculo	[células.mL ⁻¹]	3,67x10⁸±5,18x10⁸	1,04x10⁶±6,18x10⁵	9,08x10⁵±1,91x10⁵
	Viabilidade (%)	100±1	53±62	69±31

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A cerveja, como produto final fermentado, é uma matriz química complexa que resulta de numerosas reacções metabólicas e químicas, decorrentes da interacção da levedura com compostos presentes no mosto (He *et al.*, 2014). Compostos de *flavour* e aroma, cuja combinação caracteriza a qualidade e palato da cerveja, decorrem do metabolismo da levedura, fazendo com que grande parte do valor final desta bebida esteja directamente correlacionado com o desempenho da levedura durante a fase fermentativa. Utilizando este conhecimento como ferramenta exploratória, foi testada a possibilidade de co-inoculação de leveduras não-convencionais na produção de cerveja.

Apesar da existência de diversos artigos de revisão que abordam a temática da contribuição de leveduras não-*Saccharomyces* em cerveja (Basso *et al.*, 2016; Gibson *et al.*, 2013; Vanderhaegen *et al.*, 2003), os artigos exploratórios são ainda escassos, e tendo em conta o âmbito específico deste trabalho, a co-fermentação de mosto de cerveja apenas foi investigada por um número limitado de autores (Sarens & Swiegers, 2014; Canonico *et al.*, 2016; Tataridis *et al.*, 2013).

O modelo de co-fermentação sequencial apresentado no presente trabalho foi bem sucedido, não tendo ocorrido nenhuma fermentação estagnada. Todos os ensaios fermentativos, conseguiram esgotar, com poucas diferenças entre si, os açúcares presentes no mosto, produzindo concomitantemente etanol, glicerol e variados produtos metabólicos secundários voláteis e não-voláteis. Numa ótica exclusivamente microbiológica observou-se, em todos os ensaios, tal como esperado, que a estirpe comercial co-inoculada conseguiu sobrepôr-se ao inóculo não-convencional entre 24 e 48 horas após inoculação. Como consequência desse domínio, a concentração de células viáveis cultiváveis das leveduras não-convencionais decresceu, mantendo-se, no entanto, estável a concentração de células metabolicamente activas dessas estirpes.

Em relação aos parâmetros básicos determinados verificou-se apenas diferenças pontuais, augurando que a introdução das leveduras não-convencionais não afecta de forma significativa o rendimento do processo fermentativo em relação aos produtos metabólicos principais. Apesar das características analíticas entre as cervejas produzidas por co-fermentação indicarem fraca distinção dentro de cada estilo, observou-se uma maior complexidade sensorial face às cervejas de controlo, com ênfase na componente aromática. As conclusões retiradas a partir da análise sensorial contrariaram a aparente homogeneidade analítica dos ensaios, reforçando a noção de que, apesar da análise estatística realizada ao perfil físico-químico e aromático das cervejas ter revelado uma fraca distinção entre os ensaios, não se pode transpor essas inferências em termos da percepção sensorial. Nesta ótica, a co-fermentação com estirpes de leveduras não-*Saccharomyces* revelou uma contribuição positiva para o perfil sensorial das cervejas dos estilos *Stout* e *Dunkel*, revelando assim potencial tanto em cervejas de alta como baixa fermentação, sem, no entanto, afectar a adequação das cervejas ao estilo. A menor apreciação do estilo *Weiss* poderá estar relacionada com o substrato, nomeadamente devido à quantidade de maltes de especialidade utilizada na produção do mosto. Os estilos *Stout* e *Dunkel* foram produzidos com cerca de 18 % (m/m) de malte de especialidade, enquanto que a *Weiss* somente incluiu

4,5 % (m/m). Este trabalho permitiu fazer uma triagem das leveduras com maior potencial dentro da fermentação de cerveja, constatando que as estirpes de leveduras não-*Saccharomyces*, nomeadamente *K. apiculata* e *T. delbrueckii* e em menor grau *D. bruxellensis*, podem acrescentar valor sensorial a estilos de cervejas específicos, com ênfase em estilos de cervejas que pressupõem maior adição de maltes torrados/especialidade.

Em termos de trabalho futuro, a base construída neste documento pode ser ramificada em diversas linhas de investigação. Por um lado, seria pertinente explorar a hipótese de co-inoculação destas leveduras noutros estilos de cerveja, ou até a combinação de mais de uma estirpe de levedura não-convencional na co-fermentação de cerveja. Por outro lado, existem outros géneros e espécies de leveduras que, mediante triagem, podem revelar-se igualmente interessantes para co-fermentação em cerveja. Tendo em conta a menor incorporação de lúpulo nos mostos produzidos, o estudo da interacção destas leveduras com compostos derivados do lúpulo através da co-inoculação de mostos mais lupulados seria pertinente, uma vez que o estudo de (Sarens and Swiegers 2014) revelou resultados promissores em *Pichia kluyveri*. A complexidade da fracção aromática da cerveja produzida por exclusiva manipulação da fase de fermentação é um ponto fulcral de investigação futura, permitindo a criação de cervejas inovadoras.

6. BIBLIOGRAFIA

- Agilent Technologies. 2017. "2 mL Wide Opening (9 Mm) Screw Top Vials and Packs." [on-line] Consultado a: 12/1/2016. Disponível em: [http://www.agilent.com/en-us/products/lab-supplies/chromatography-spectroscopy/vials-closures/2-ml-wide-opening-\(9-mm\)-screw-top-vials-packs](http://www.agilent.com/en-us/products/lab-supplies/chromatography-spectroscopy/vials-closures/2-ml-wide-opening-(9-mm)-screw-top-vials-packs).
- Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., e Gírio, F. 2010. "Saccharomyces Cerevisiae CCM1 885 Secretes Peptides That Inhibit the Growth of Some Non-Saccharomyces Wine-Related Strains." *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (3). Springer-Verlag: 965–72. doi:10.1007/s00253-009-2409-6.
- Alibaba Group. 2017. "25' Stainless Steel Immersion Wort Chiller Pre Chiller Wort Cooling Coil for Homebrew." <https://www.aliexpress.com/item/25-Stainless-Steel-Immersion-Wort-Chiller-Pre-Chiller-wort-cooling-coil-for-homebrew/32529672752.html?spm=2114.40010208.4.8.xZXPzt>.
- Alves-Araújo, C., Pacheco, A., Almeida, M.J., Spencer-Martins, I., Leão, C. e Sousa, M.J. 2007. "Sugar Utilization Patterns and Respiro-Fermentative Metabolism in the Baker's Yeast *Torulaspora Delbrueckii*." *Microbiology* 153 (3): 898–904. doi:10.1099/mic.0.2006/003475-0.
- Anderson, Raymond. 2006. "History of Industrial Brewing." In *Handbook of Brewing*, editado por Fergus Priest and Graham Stewart, 2nd ed., 1–37. CRC Press.
- Andrés-Iglesias, C., Nešpor, J., Karabín, M., Montero, O., Blanco, C.A., e Dostálek, P. 2016. "Comparison of Carbonyl Profiles from Czech and Spanish Lagers: Traditional and Modern Technology." *LWT - Food Science and Technology* 66: 390–97. doi:10.1016/j.lwt.2015.10.066.
- Bamforth, Charles. 2003. *Beer: Tap into the Art and Science of Brewing*. 2nd ed. Oxford University Press.
- Barnett, J.A., e Entian, K. 2005. "A History of Research on Yeasts 9: Regulation of Sugar Metabolism." *Yeast* 22 (11). John Wiley & Sons, Ltd.: 835–94. doi:10.1002/yea.1249.
- Barrajón, N., Arévalo-Villena, M., Úbeda, J. e Briones, A. 2011. "Enological Properties in Wild and Commercial *Saccharomyces Cerevisiae* Yeasts: Relationship with Competition during Alcoholic Fermentation." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (11). Springer Netherlands: 2703–10. doi:10.1007/s11274-011-0744-0.
- Barrajón, N., Arévalo-Villena, M., Úbeda, J. e Briones, A. 2010. "Competition between Spontaneous and Commercial Yeasts in Winemaking: Study of Possible Factors Involved." *Current Research, Technology and Education\Topics in Applied Microbiology\and Microbial Biotechnology* 2 (2): 1035–41.

Basso, R.F., Alcarde, A.R. e Portugal, C.B. 2016. "Could Non-Saccharomyces Yeasts Contribute on Innovative Brewing Fermentations?" *Food Research International* 86. Elsevier Ltd: 112–20. doi:10.1016/j.foodres.2016.06.002.

Beer Infinity. 2014. "How Viable Is Electric Brewing?" [on-line] Consultado a: 23/12/2016. Disponível em: <http://www.beerinfinity.com/how-viable-is-electric-brewing-rims/>.

Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I. e Dubourdieu, D. 2008. "Impact of Mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces Cerevisiae* Culture on High-Sugar Fermentation." *International Journal of Food Microbiology* 122 (3): 312–20. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023.

Berkhout, B., Berting, L., Bleeker, Y., de Wit, W., Kruis, G., Stokkel, R. e Theuws, R. 2013. The Contribution Made by Beer to the European Economy. [on-line] Consultado a: 15/6/2016. Disponível em: http://www.brewersofeurope.org/site/media-centre/index.php?doc_id=624&class_id=31&detail=true

Bilbao, A., Irastorza, A. Duenas, M. e Fernandez, K. 1997. "The Effect of Temperature on the Growth of Strains of *Kloeckera Apiculata* and *Saccharomyces Cerevisiae* in Apple Juice Fermentation." *Letters in Applied Microbiology* 24 (1): 37–39. doi:10.1046/j.1472-765X.1997.00340.x.

Bisht, Priyanka. 2015. "Beer Industry Analysis & Global Beer Market Report." [on-line] Consultado a 10/12/2016. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/beer-market>

Blomqvist, J., Eberhard, T., Schnürer, J. e Passoth, V. 2010. "Fermentation Characteristics of *Dekkera Bruxellensis* Strains." *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (4). Springer-Verlag: 1487–97. doi:10.1007/s00253-010-2619-y.

Bokulich, N.A. e Bamforth, C.W. 2013. "The Microbiology of Malting and Brewing." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77 (2): 157–72. doi:10.1128/MMBR.00060-12.

Boulton, C., e Quain, D. 2008. *Brewing Yeast and Fermentation*. John Wiley & Sons.

Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M.G., Caldeira, J. e Albergaria, H. 2014. "Identification of Novel GAPDH-Derived Antimicrobial Peptides Secreted by *Saccharomyces Cerevisiae* and Involved in Wine Microbial Interactions." *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (2): 843–53. doi:10.1007/s00253-013-5411-y.

Brewer's Friend. 2013. "Beer Priming Calculator." [on-line] Consultado a: 20/5/2016. Disponível em: <http://www.brewersfriend.com/beer-priming-calculator/>.

Briggs, D.E., Boulton, C.A., Brookes, P.A. e Steven, R. 2004. *Brewing: Science and Practice*. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol. 86. doi:10.1002/jsfa.2344.

Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F. e Ciani, M. 2016. "*Torulaspora Delbrueckii* in the Brewing Process: A New Approach to Enhance Bioflavour and to Reduce Ethanol Content." *Food Microbiology* 56. Elsevier Ltd: 45–51. doi:10.1016/j.fm.2015.12.005.

- Cheraiti, N., Guezenc, S. e Salmon, J.M. 2005. "Redox Interactions between *Saccharomyces Cerevisiae* and *Saccharomyces Uvarum* in Mixed Culture under Enological Conditions." *Applied and Environmental Microbiology* 71 (1): 255–60. doi:10.1128/AEM.71.1.255-260.2005.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I. e Domizio, P. 2010. "Controlled Mixed Culture Fermentation: A New Perspective on the Use of Non- *Saccharomyces* Yeasts in Winemaking." *FEMS Yeast Research* 10 (2). Oxford University Press: 123–33. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x.
- Ciani, M., e Picciotti, G. 1995. "The Growth Kinetic and Fermentation Behaviour of Some Non-*Saccharomyces* Yeast Associated with Wine-Making." *Biotechnology Letters* 17 (II): 1247–50.
- Coghe, S., D'Hollander, H., Verachtert, H. e Delvaux, F.R. 2005. "Impact of Dark Specialty Malts on Extract Composition and Wort Fermentation." *Journal of the Institute of Brewing* 111 (1). Blackwell Publishing Ltd: 51–60. doi:10.1002/j.2050-0416.2005.tb00648.x.
- Colen, L. e Swinnen, J. 2016. "Economic Growth, Globalisation and Beer Consumption." *Journal of Agricultural Economics* 67 (1): 186–207. doi:10.1111/1477-9552.12128.
- Coote, N. e Kirsop, B.H. 1974. "The Content of Some Organic Acids in Beer and Other Fermented Media." *Journal of the Institute of Brewing*, 474–83.
- Crauwels, S., Steensels, J., Aerts, G., Willems, K.A., Verstrepen, K.J. 2015. "Brettanomyces *Bruxellensis*, Essential Contributor in Spontaneous Beer Fermentations Providing Novel Opportunities for the Brewing Industry," *Brewing Science* no.68 pp:110-121.
- De Keukeleire, D. 2000. "Fundamentals of Beer and Hop Chemistry." *Química Nova* 23 (1). SBQ: 108–12. doi:10.1590/S0100-40422000000100019.
- Denault, L.J., Glenister, P.R. e Chau, S. 1981. "Enzymology of the Mashing Step During Beer Production." *ASBC Journal* 39 (2): 46–52.
- Dequin, S. 2001. "The Potential of Genetic Engineering for Improving Brewing, Wine-Making and Baking Yeasts." *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (5–6): 577–88.
- Di Maro, E., Ercolini, D. e Coppola, S. 2007. "Yeast Dynamics during Spontaneous Wine Fermentation of the Catalanesca Grape." *International Journal of Food Microbiology* 117 (2): 201–10. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.007.
- Díaz-Montañó, D.M., e Córdova, J. 2009. "The Fermentative and Aromatic Ability of *Kloeckera* and *Hanseniaspora* Yeasts." In *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, 281–307. Springer.
- Díaz-Montañó, D.M., Délia, M.L., Estarrón-Espinosa, M. e Strehaiano, P. 2008. "Fermentative Capability and Aroma Compound Production by Yeast Strains Isolated from Agave Tequilana Weber Juice." *Enzyme and Microbial Technology* 42 (7): 608–16. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.12.007.
- Eaton, B. 2006. "An Overview of Brewing." In *Handbook of Brewing*, editado por Fergus Priest e Stewart Graham, 2nd ed., 77–91. CRC Press.

- Eblinger, H., e Narzib, L. 2012. "Beer." In Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 177–221. Weinheim: Wiley-VCH.
- Elzinga, K.G., Tremblay, C.H. e Tremblay, V.J. 2015. "Craft Beer in the United States: History, Numbers, and Geography." *Journal of Wine Economics* 10 (3): 242–74. doi:10.1017/jwe.2015.22.
- Engan, S. 1972. "Organoleptic Threshold Values of Some Alcohols and Esters in Beer." *Journal of the Institute of Brewing* 78 (1): 33–36. doi:10.1002/j.2050-0416.1972.tb03425.x.
- Engan, S. 1974. "ORGANOLEPTIC THRESHOLD VALUES OF SOME ORGANIC ACIDS IN BEER." *Journal of the Institute of Brewing* 80 (2). Blackwell Publishing Ltd: 162–63. doi:10.1002/j.2050-0416.1974.tb03598.x.
- Erten, H. 2002. "Relations between Elevated Temperatures and Fermentation Behaviour of *Kloeckera Apiculata* and *Saccharomyces Cerevisiae* Associated with Winemaking in Mixed Cultures." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18 (4). Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers: 377–82. doi:10.1023/A:1015221406411.
- Escalante, W.E. e Escalante, W.D.E. 2012. "Influencia de la aireación en la actividad fermentativa de *kloeckera apiculata* durante la fermentación de jugo de manzana." *Acta Biológica Colombiana* 17 (2): 309–22.
- FAO. 2009. "FAO Agribusiness Handbook: Barley, Malt and Beer," 65.
- Fay, J.C., e Benavides, J.A. 2005. "Evidence for Domesticated and Wild Populations of *Saccharomyces Cerevisiae*." *PLoS Genetics* 1 (1): e5. doi:10.1371/journal.pgen.0010005.
- Fugelsang, K. e Edwards, C. 2007. *Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures*. Springer.
- Gancedo, J.M. 1998. "Yeast Carbon Catabolite Repression." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 62 (2). American Society for Microbiology: 334–61.
- German Esteves, M., Rickert, S. e Sängler, F. 2015. "A Perfect Storm Brewing in the Global Beer Business." McKinsey and Company. [on-line] Consultado a: 10/7/2016. Disponível em: <http://www.mckinsey.com/business-functions/marketing-and-sales/our-insights/a-perfect-storm-brewing-in-the-global-beer-business>
- Gibson, B., Krogerus, K., Ekberg, J., Mikkelsen, A., Pentikäinen, S., Wilpola, A. e Vidgren, V. 2013. "Non-Conventional Yeast as a New Tool for Beer Flavour Modification," VTT Technical Research Centre of Finland. [on-line] Consultado a: 23/3/2016. Disponível em: <http://beer.suregork.com/wp-content/uploads/2015/06/Poster-89.pdf>
- Gupta, M., Abu-Ghannam, N. e Gallagher, E. 2010. "Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of Its By-Products." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9 (3). Blackwell Publishing Inc: 318–28. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00112.x.

- Hazelwood, L.A., Daran, J., van Maris, A., Pronk, J.T. e Dickinson, J.R. 2008. "The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: A Century of Research on *Saccharomyces Cerevisiae* Metabolism." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8). American Society for Microbiology (ASM): 2259–66. doi:10.1128/AEM.02625-07.
- He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, X., Liu, J. e Chen, L. 2014. "Wort Composition and Its Impact on the Flavour-Active Higher Alcohol and Ester Formation of Beer - A Review." *Journal of the Institute of Brewing* 120 (3): 157–63. doi:10.1002/jib.145.
- Hieronymus, S. 2012. *For the Love of Hops : The Practical Guide to Aroma, Bitterness, and the Culture of Hops*. Colorado: Brewers publications.
- Hiralal, L., Olaniran, A.O. e Pillay, B. 2014. "Aroma-Active Ester Profile of Ale Beer Produced under Different Fermentation and Nutritional Conditions." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117 (1): 57–64. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.06.002.
- Hornsey, I.S. 2003. *A History of Beer and Brewing*. Royal Society of Chemistry.
- Jimure, T. e Sato, K. 2013. "Beer Proteomics Analysis for Beer Quality Control and Malting Barley Breeding." doi:10.1016/j.foodres.2012.11.028.
- Kitagaki, H. e Takagi, H. 2014. "Mitochondrial Metabolism and Stress Response of Yeast: Applications in Fermentation Technologies." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117 (4): 383–93. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.09.011.
- Klopper, W. J., Angelino, S.A., Tuning, B. e Vermeire, H.A. 1986. "Organic Acids and Glycerol in Beer." *J. Inst. Brew* 92 (May-June). Blackwell Publishing Ltd: 225–28. doi:10.1002/j.2050-0416.1986.tb04405.x.
- Krogerus, K., e Gibson, B.R. 2013. "125th Anniversary Review: Diacetyl and Its Control during Brewery Fermentation." *Journal of the Institute of Brewing* 119 (3): 86–97. doi:10.1002/jib.84.
- Krogerus, K., Magalhães, F., Vidgren, V. e Gibson, B. 2015. "New Lager Yeast Strains Generated by Interspecific Hybridization." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 42 (5). Springer: 769–78. doi:10.1007/s10295-015-1597-6.
- Kumara, H. e Verachtert, H. 1991. "Identification of Lambic Superattenuating Micro-Organisms by the Use of Selective Antibiotics." *Journal of The Institute of Brewing & Distilling* 97: 181–85. doi:10.1002/j.2050-0416.1991.tb01064.x.
- Kurtzman, C. P., Fell, J.W. e Boekhout, T. 2010. *The Yeasts : A Taxonomic Study*. Elsevier.
- Lafond, M., Navarro, D., Haon, M., Couturier, M. e Berrin, J. 2012. "Characterization of a Broad-Specificity β -Glucanase Acting on β -(1,3)-, β -(1,4)-, and β -(1,6)-Glucans That Defines a New Glycoside Hydrolase Family." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (24). American Society for Microbiology: 8540–46. doi:10.1128/AEM.02572-12.

- Leitão, A.L., Costa, M.C. e Enguita, F.J. 2017. "Applications of Genome Editing by Programmable Nucleases to the Metabolic Engineering of Secondary Metabolites." *Journal of Biotechnology* 241: 50–60. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.11.009.
- Lewis, J G, Learmonth, R.P. e Watson, K. 1993. "Freeze-Thaw Stress Resistance of Role of Growth Phase and Ethanol in Freeze-Thaw Stress Resistance of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Applied and Environmental Microbiology* 59 (4): 1065–71.
- Lewis, M. e Young. T.M. 2002. *Brewing*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. Springer science.
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M.A., Morata, A., Tesfaye, M., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I. e Suárez-Lepe, J.A. 2014. "Influence of Sequential Fermentation with *Torulaspora Delbrueckii* and *Saccharomyces Cerevisiae* on Wine Quality." *LWT - Food Science and Technology* 59 (2): 915–22. doi:10.1016/j.lwt.2014.06.019.
- Loira, I., Morata, A., Comuzzo, P. Callejo, M., González, C., Calderón, J. e Suarez-Lepe. 2015. "Use of *Schizosaccharomyces Pombe* and *Torulaspora Delbrueckii* Strains in Mixed and Sequential Fermentations to Improve Red Wine Sensory Quality." *Food Research International* 76. Elsevier Ltd: 325–33. doi:10.1016/j.foodres.2015.06.030.
- Loureiro, V, e Malfeito-Ferreira, M. 2003. "Spoilage Yeasts in the Wine Industry." *International Journal of Food Microbiology* 86 (1–2): 23–50.
- Lu, Y., Huang, D., Lee, P. e Liu, S. 2015. "Effects of Cofermentation and Sequential Inoculation of *Saccharomyces Bayanus* and *Torulaspora Delbruckii* on Durian Wine Composition." *International Journal of Food Science & Technology* 50 (12): 2653–63. doi:10.1111/ijfs.12937.
- Masschelein, C.A. 1986. "The Biochemistry of Maturation." *Journal of the Institute of Brewing* 92 (3). Blackwell Publishing Ltd: 213–19. doi:10.1002/j.2050-0416.1986.tb04403.x.
- Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, G. 1995. "The Yeast Spectrum of the tea Fungus Kombucha" *Mycoses* 38 (7–8): 289–95. doi:10.1111/j.1439-0507.1995.tb00410.x.
- McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A. e Nuñez, A. 2004. "Fermented Beverages of Pre- and Proto-Historic China." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (51): 17593–98. doi:10.1073/pnas.0407921102.
- Meilgaard, M.C., Dalglish, C.E. e Clapperton, J.F. 1979. "Beer Flavour Terminology 1." *Journal of the Institute of Brewing* 85 (1). Blackwell Publishing Ltd: 38–42. doi:10.1002/j.2050-0416.1979.tb06826.x.
- Meilgaard, M.C. 1975. "Flavor Chemistry in Beer: Part II: Flavor and Flavor Threshold of 239 Aroma Volatiles." *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly* 12 (3): 151–68.
- Meussdoerffer, Franz. 2009. "A Comprehensive History of Beer Brewing." In *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*, 1–42. Wiley-VCH.

- Michel, M., Kopecká, J., Meier-Dörnberg, T., Zarnkow, M. Jacob, F. e Hutzler, M. 2016. "Screening for New Brewing Yeasts in the Non-Saccharomyces Sector with *Torulaspora Delbrueckii* as Model." *Yeast* 33 (4): 129–44. doi:10.1002/yea.3146.
- Moll, M. 1979. "Water in Malting and Brewing." *Brewing Science* 1: 539–77.
- Morneau, A.D, Zuehlke, J.M. e Edwards, C.G. 2011. "Comparison of Media Formulations Used to Selectively Cultivate *Dekkera/Brettanomyces*." *Letters in Applied Microbiology* 53 (4): 460–65. doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03133.x.
- Mousia, Z., Balkin, R.C., Pandiella, S.S. e Webb, C. 2004. "The Effect of Milling Parameters on Starch Hydrolysis of Milled Malt in the Brewing Process." *Process Biochemistry* 39 (12): 2213–19. doi:10.1016/j.procbio.2003.11.015.
- Nance, M.R. e Setzer, W.N. 2011. "Volatile Components of Aroma Hops (*Humulus Lupulus* L.) Commonly Used in Beer Brewing." *Journal of Brewing and Distilling* 2 (2): 16–22.
- Nelson, M., André, J., Bagnall, R.S., Bookidis, N., Murray, O., Both, F. e Bottéro, J. 2003. "The Cultural Construction of Beer Among Greeks and Romans." *Syllecta Classica* 14 (1). Department of Classics, University of Iowa: 101–20. doi:10.1353/syl.2003.0005.
- Nevoigt, E. e Stahl, U. 1997. "Osmoregulation and Glycerol Metabolism in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *FEMS Microbiology Reviews* 21 (3): 231–41. doi:10.1016/S0168-6445(97)00058-2.
- Oliver, G. 2011. "The Oxford Companion to Beer." pp-960. doi:10.2307/3399872.
- Palmer, J., e Kaminski, C. 2013. *Water: A Comprehensive Guide for Brewers*. 1st ed. Colorado: Brewers publications.
- Papazian, C. 2006. "Beer Styles: Their Origins and Classification." In *Handbook of Brewing*, edited by Fergus Priest and Graham Stewart, 2nd ed., 39–77. CRC Press.
- Peddie, H.A.B. 1990. "Ester Formation In Brewery Fermentations." *Journal of the Institute of Brewing* 96 (5). Blackwell Publishing Ltd: 327–31. doi:10.1002/j.2050-0416.1990.tb01039.x.
- Pfeiffer, T., Morley, A., Nägele, T., Hannibal, L. e Clinic, C. 2014. "An Evolutionary Perspective on the Crabtree Effect." doi:10.3389/fmolb.2014.00017.
- Pires, E.J., Teixeira, J.A., Brányik, T. e Vicente, A.A. 2014. "Yeast: The Soul of Beer's Aroma - A Review of Flavour-Active Esters and Higher Alcohols Produced by the Brewing Yeast." *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (5): 1937–49. doi:10.1007/s00253-013-5470-0.
- "Portaria no1/96." 1996. *Diário Da República*, 8–9.
- Quain, D.E. 1986. "Differentiation of Brewing Yeast." *Journal of the Institute of Brewing* 92: 435–38.
- Querol, A. e Bond, U. 2009. "The Complex and Dynamic Genomes of Industrial Yeasts." *FEMS Microbiology Letters* 293 (1): 1–10. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01480.x.

- Rainieri, S., Zambonelli, C. e Kaneko, Y. 2003. "Saccharomyces Sensu Stricto: Systematics, Genetic Diversity and Evolution." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96 (1). Elsevier: 1–9. doi:10.1016/S1389-1723(03)90089-2.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P. Lagarrigue, P. Lonvaud-Funel, A. e Bely, M. 2009. "Genetic Characterization and Phenotypic Variability in *Torulaspora Delbrueckii* Species: Potential Applications in the Wine Industry." *International Journal of Food Microbiology* 134 (3): 201–10. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.008.
- Rodman, A.D. e Gerogiorgis, D. 2016. "Multi-Objective Process Optimisation of Beer Fermentation via Dynamic Simulation." *Food and Bioprocess Processing*, 255–74. doi:10.1016/j.fbp.2016.04.002.
- Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, F. e Manzanares, P. 2003. "Acetate Ester Formation in Wine by Mixed Cultures in Laboratory Fermentations." *International Journal of Food Microbiology* 86 (1–2): 181–88.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. e Capece, A. 2003. "Function of Yeast Species and Strains in Wine Flavour." *International Journal of Food Microbiology* 86 (1–2): 169–80. doi:10.1016/S0168-1605(03)00290-3.
- Rozpędowska, E. Hellborg, L., Ishchuk, O.P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, S., Woolfit, M., Compagno, C. e Piskur, J. 2011. "Parallel Evolution of the Make-Accumulate-Consume Strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* Yeasts." *Nature Communications* 2 (may). Nature Publishing Group: 302. doi:10.1038/ncomms1305.
- Russell, I. 2006. "Yeast." In *Handbook of Brewing*, edited by Fergus Priest and Graham Stewart, 2nd ed., 281–333. CRC Press.
- Saison, D., De Schutter, D.P., Delvaux, F. e Delvaux, F.R. 2008. "Optimisation of a Complete Method for the Analysis of Volatiles Involved in the Flavour Stability of Beer by Solid-Phase Microextraction in Combination with Gas Chromatography and Mass Spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1190 (1–2): 342–49. doi:10.1016/j.chroma.2008.03.015.
- Saison, D., De Schutter, D.P., Uyttenhove, B., Delvaux, F. e Delvaux, F.R. 2009. "Contribution of Staling Compounds to the Aged Flavour of Lager Beer by Studying Their Flavour Thresholds." *Food Chemistry* 114 (4): 1206–15. doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.078.
- Sarens, S. e Swiegers, J.H. 2014. Enhancement of beer flavor by a combination of *Pichia* yeast and different hop varieties. US20140234480A1, issued 2014.
- Scanes, K.T., Hohmann, S. e Prior, B. 1998. "Glycerol Production by the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* and Its Relevance to Wine: A Review." *South African Journal of Enology and Viticulture* 19 (1): 17–24.
- Scannell, D.R., Zill, O.A., Rokas, A., Payen, C., Dunham, M.J., Eisen, M.B., Rine, J., Johnston, M. e Hittinger, C.J. 2011. "The Awesome Power of Yeast Evolutionary Genetics: New Genome Sequences

and Strain Resources for the *Saccharomyces Sensu Stricto* Genus." G3 (Bethesda, Md.) 1 (1): 11–25. doi:10.1534/g3.111.000273.

Schifferdecker, A.J., Dashko, S., Ishchuk, O.P. e Piškur, J. 2014. "The Wine and Beer Yeast *Dekkera Bruxellensis*." Yeast (Chichester, England) 31 (9). Wiley-Blackwell: 323–32. doi:10.1002/yea.3023.

Schneider, R. 2004. "Genetics , Molecular and Cell Biology of Yeast." Yeast Genetics, no. January: 1–86.

Siddiqui, M.S., Thodey, K., Trenchard, I. e Smolke, C.D. 2012. "Advancing Secondary Metabolite Biosynthesis in Yeast with Synthetic Biology Tools." FEMS Yeast Research. doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00774.x.

Sosa, O.A., de Nadra, M.C.M. e Fariás, M.E. 2008. "Behaviour of *Kloeckera Apiculata* Flocculent Strain in Coculture with *Saccharomyces Cerevisiae*." Food Technology and Biotechnology 46 (4): 413–18.

Steensels, J., Daenen, D., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H. e Verstrepen, K.J. 2015. "Brettanomyces Yeasts - From Spoilage Organisms to Valuable Contributors to Industrial Fermentations." International Journal of Food Microbiology 206 (April): 24–38. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005.

Steensels, J. e Verstrepen, K.J. 2014. "Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations." Annual Review of Microbiology 68 (1). Annual Reviews: 61–80. doi:10.1146/annurev-micro-091213-113025.

Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J.J., Sørensen, D., Broomer, A., Oliveira, A., Perry-O'Keefe, H., Sage, A., Young, B. e Coull, J. 2001. "Identification of *Dekkera Bruxellensis* (*Brettanomyces*) from Wine by Fluorescence in Situ Hybridization Using Peptide Nucleic Acid Probes." Applied and Environmental Microbiology 67 (2): 938–41. doi:10.1128/AEM.67.2.938-941.2001.

Strejc, J., Šiřišťová, L., Karabín, M. e Almeida e Silva, J.B. e Brányik, T. 2013. "Production of Alcohol-Free Beer with Elevated Amounts of Flavouring Compounds Using Lager Yeast Mutants." Journal of the Institute of Brewing 119 (3): n/a-n/a. doi:10.1002/jib.72.

Strong, G. e England, K. 2015. "Beer Judge Certification Program 2015 Style Guidelines." Beer Judge Certification Program, 93.

Suomalainen, H. e Lehtonen, M. 1979. "The Production Of Aroma Compounds By Yeast." Journal of the Institute of Brewing 85 (3). Blackwell Publishing Ltd: 149–56. doi:10.1002/j.2050-0416.1979.tb06846.x.

Swangkeaw, J., Vichitphan, S., Butzke, C.E. e Vichitphan, K. 2009. "The Characterisation of a Novel *Pichia Anomala* β -Glucosidase with Potentially Aroma-Enhancing Capabilities in Wine." Annals of Microbiology 59 (2): 335–43. doi:10.1007/BF03178336.

Swinnen, Johan F. M. 2011. The Economics of Beer. Oxford University Press.

- Tataridis, P., Kanelis, A., Logotetis, S. e Nerancis, E. 2013. "Use of Non-Saccharomyces Torulaspora Delbrueckii Yeast Strains in Winemaking and Brewing." *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, no. 124: 415–26. doi:10.2298/ZMSPN1324415T.
- Taylor, D. 2006. "Water." In *Handbook of Brewing*, edited by Fergus G. Priest and Graham Stewart, 2nd ed., 93–135. CRC Press.
- Ullrich, S.E. 2011. *Barley : Production, Improvement, and Uses*. Wiley-Blackwell.
- van der Aa Kühle, A. e Jespersen, L. 1998. "Detection and Identification of Wild Yeasts in Lager Breweries." *International Journal of Food Microbiology* 43 (3): 205–13. doi:10.1016/S0168-1605(98)00113-5.
- Van Oevelen, D., Spaepen, M., Timmermans, P. e Verachtert, H. 1977. "Microbiological Aspects Of Spontaneous Wort Fermentation In The Production Of Lambic And Gueuze." *Journal of the Institute of Brewing* 83 (6). Blackwell Publishing Ltd: 356–60. doi:10.1002/j.2050-0416.1977.tb03825.x.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G. e Verachtert, H. 2003. "Bioflavoring and Beer Refermentation." *Applied Microbiology and Biotechnology* 62 (2–3): 140–50. doi:10.1007/s00253-003-1340-5.
- Vengadaramana, A. 2013. "Industrial Important Microbial Alpha-Amylase on Starch-Converting Process." *Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP) Sch. Acad. J. Pharm* 2 (3): 209–21.
- Venturin, C., Boze, H., Moulin, G. e Galzy, P. 1995. "Glucose Metabolism, Enzymic Analysis and Product Formation in Chemostat Culture of *Hanseniaspora Uvarum*." *Yeast* 11 (4): 327–36. doi:10.1002/yea.320110405.
- Viana, T., Loureiro-Dias, M.C., Loureiro, V. e Prista, C. 2012. "Peculiar H⁺ Homeostasis of *Saccharomyces Cerevisiae* during the Late Stages of Wine Fermentation." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (17). American Society for Microbiology: 6302–8. doi:10.1128/AEM.01355-12.
- Vidgren, V. 2010. *Maltose and Maltotriose Transport into Ale and Lager Brewer's Yeast Strains*. VTT Publications.
- Vivian, A.F., Aoyagui, C.T., de Oliveira, D.N. e Catharino, R.R. 2016. "Mass Spectrometry for the Characterization of Brewing Process." *Food Research International* 89. Elsevier Ltd: 281–88. doi:10.1016/j.foodres.2016.08.008.
- Wales, D.S. e Cartledge, T.G. 1980. "Effects of Glucose Repression and Anaerobiosis on the Activities and Subcellular Distribution of Tricarboxylic Acid Cycle and Associated Enzymes in *Saccharomyces Carlsbergensis*." *Journal of General ...*, no. 1 969: 93–98. doi:10.1099/00221287-116-1-93.
- Walker, G. e Stewart, G. 2016. "Saccharomyces Cerevisiae in the Production of Fermented Beverages." *Beverages* 2 (4): 30. doi:10.3390/beverages2040030.

- Wang, C., Esteve-Zarzoso, B. e Mas, A. 2014a. "Monitoring of *Saccharomyces Cerevisiae*, *Hanseniaspora Uvarum*, and *Starmerella Bacillaris* (Synonym *Candida Zemplanina*) Populations during Alcoholic Fermentation by Fluorescence in Situ Hybridization." *International Journal of Food Microbiology* 191 (August). Elsevier B.V.: 1–9. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.014.
- Wang, C., Esteve-Zarzoso, B. e Mas, A. 2014b. "Monitoring of *Saccharomyces Cerevisiae*, *Hanseniaspora Uvarum*, and *Starmerella Bacillaris* (Synonym *Candida Zemplanina*) Populations during Alcoholic Fermentation by Fluorescence in Situ Hybridization." *International Journal of Food Microbiology* 191 (November): 1–9. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.014.
- Warpala, I.W.S, e Pandiella, S.S. 2000. "Grist Fractionation and Starch Modification during the Milling of Malt." *Food and Bioproducts Processing* 78 (C2): 85–89.
- Wendland, J. 2014. "Lager Yeast Comes of Age." *Eukaryotic Cell* 13 (10). American Society for Microbiology (ASM): 1256–65. doi:10.1128/EC.00134-14.
- White, C. 1998. "7 Amazing Facts About Yeast." *Brew Your Own*. [on-line] Consultado a: 24/11/2016. Disponível em: <https://byo.com/mead/item/62-7-fascinating-facts-about-yeast>
- White, C. e Zainasheff, J. 2010. *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*. Igarss 2014. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- Whitehurst, R.J. e van. Oort, M. 2010. *Enzymes in Food Technology*. Wiley-Blackwell.
- Willaert, R. 2012. "Biochemistry of Beer Fermentation." *Food Biochemistry and Food Processing: Second Edition*, no. Meussdoerffer 2009: 627–53. doi:10.1002/9781118308035.ch33.
- Willaert, R., Willaert, R.G. e Baron, G.V. 2015. "Wort Boiling Today Wort Boiling Today – Boiling Systems with Low Thermal Stress in Combination with Volatile Stripping," no. January 2001.
- Ye, M., Yue, T. e Yuan, Y. 2014. "Effects of Sequential Mixed Cultures of *Wickerhamomyces Anomalus* and *Saccharomyces Cerevisiae* on Apple Cider Fermentation." *FEMS Yeast Research* 14 (6): 873–82. doi:10.1111/1567-1364.12175.
- Zohre, D.E. e Erten, H. 2002. "The Influence of *Kloeckera Apiculata* and *Candida Pulcherrima* Yeasts on Wine Fermentation." *Process Biochemistry* 38 (3): 319–24. doi:10.1016/S0032-9592(02)00086-9.

7. ANEXOS

Anexo I: Receitas-base e programas de brassagem

STOUT

Tabela 21- Receita e programa de brassagem do mosto *Stout*

Receita-base		Empastagem	
Malte(s)	Quantidade (g)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Pale Ale (5,9 EBC)	4000	15	45
Black (985 EBC)	200	20	60
Roasted (1000 EBC)	200	40	70
Caramel (118,2 EBC)	150	10	75
Oat Flakes (2,0 EBC)	300		
		Fase Ebulição	
Lúpulo(s)	Quantidade (g)	Lúpulo(s)	Quantidade (g) Tempo (min)
Northern Brewer	30	Northern Brewer	30 60

WEISS

Tabela 22- Receita e programa de brassagem do mosto *Weiss*

Receita-base		Empastagem	
Malte(s)	Quantidade (g)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Pilsner (3,9 EBC)	2000	15	45
Trigo (3,9 EBC)	2500	15	57
Caramel (39,4 EBC)	200	40	67
		10	78
		Fase Ebulição	
Lúpulo(s)	Quantidade (g)	Lúpulo(s)	Quantidade (g) Tempo (min)
Hallertauer Hersbrucker	20	Hallertauer Hersbrucker	20 60
Saaz	15	Saaz	15 20

DUNKEL

Tabela 23- Receita e programa de brassagem do mosto *Dunkel*

Receita-base		Empastagem	
Malte(s)	Quantidade (g)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Pale Ale (5,9 EBC)	2000	15	45
Munich (17,7 EBC)	1400	15	55
Crystal (160 EBC)	450	45	68
Crystal (50 EBC)	225	10	75
Chocolat (900 EBC)	110		
		Fase Ebulição	
Lúpulo(s)	Quantidade (g)	Lúpulo(s)	Quantidade (g) Tempo (min)
Hallertauer Hersbrucker	65	Hallertauer Hersbrucker	35 60
		Hallertauer Hersbrucker	20 30

Anexo II: Curvas de calibração HPLC

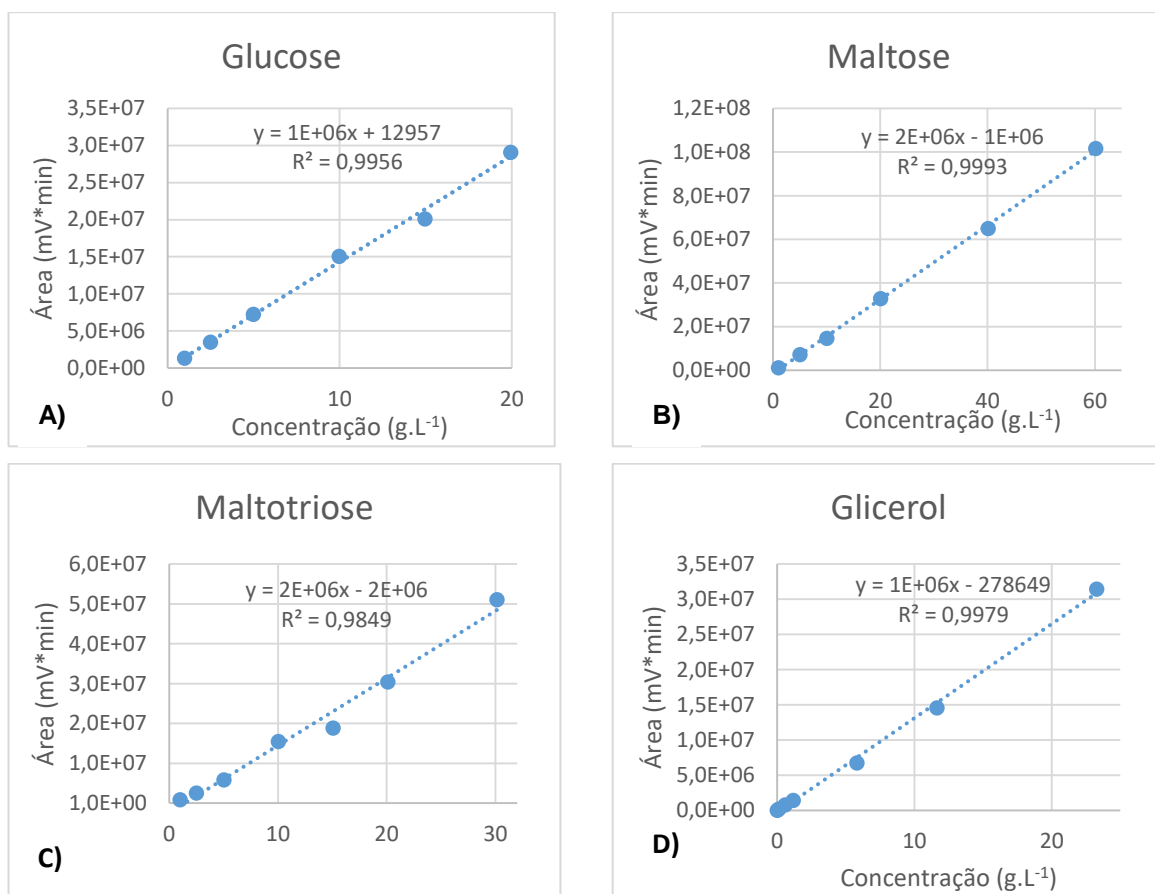


Figura 32- Curvas de calibração de açúcares e glicerol. A) Curva de calibração glucose; B) Curva de calibração maltose; C) Curva de calibração maltotriose; D) Curva de calibração glicerol.

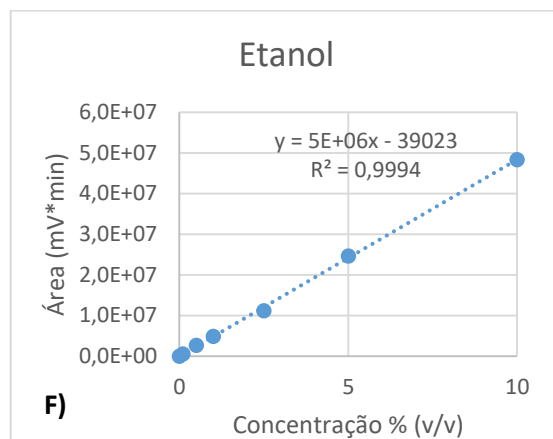
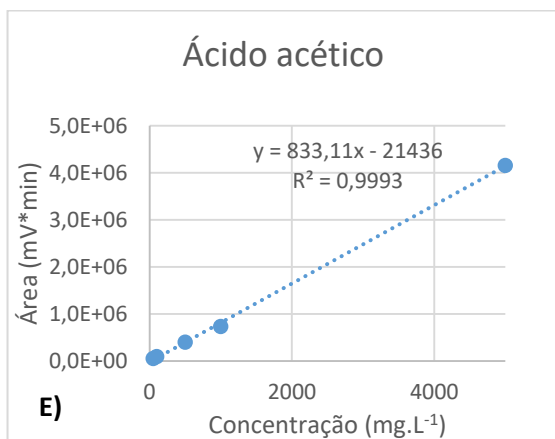
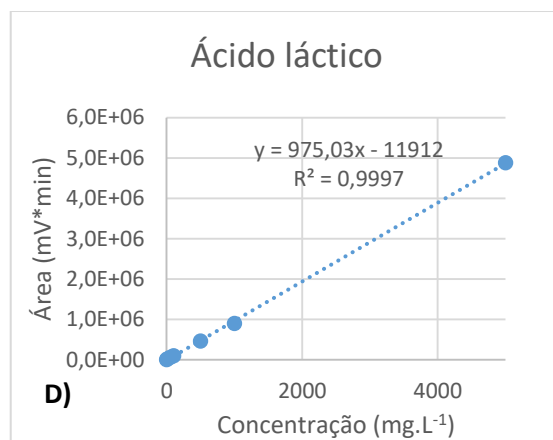
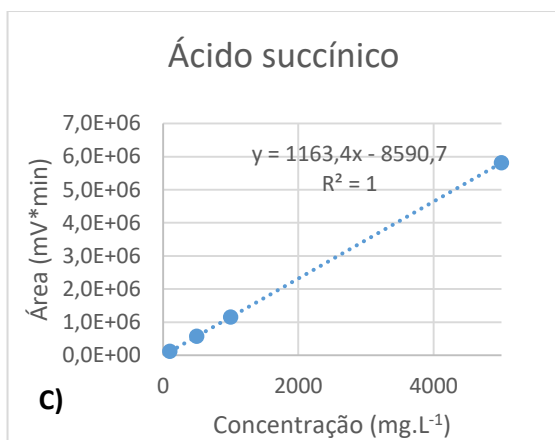
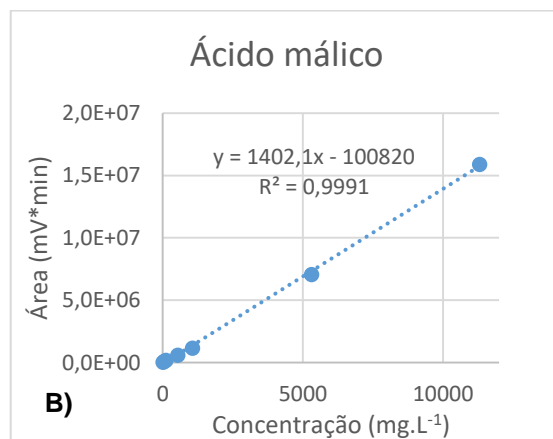
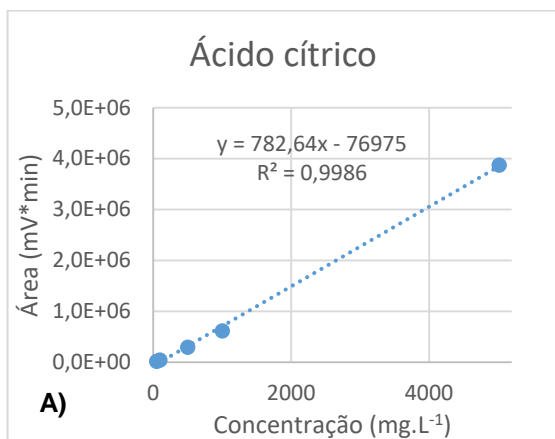


Figura 33- Curvas de calibração HPLC de ácidos orgânicos e etanol. A) Curva de calibração ácido cítrico; B) Curva de calibração ácido málico; C) Curva de calibração ácido succínico; D) Curva de calibração ácido láctico; E) Curva de calibração ácido acético; F) Curva de calibração etanol.

Anexo III: Curvas calibração e tempos de retenção GC

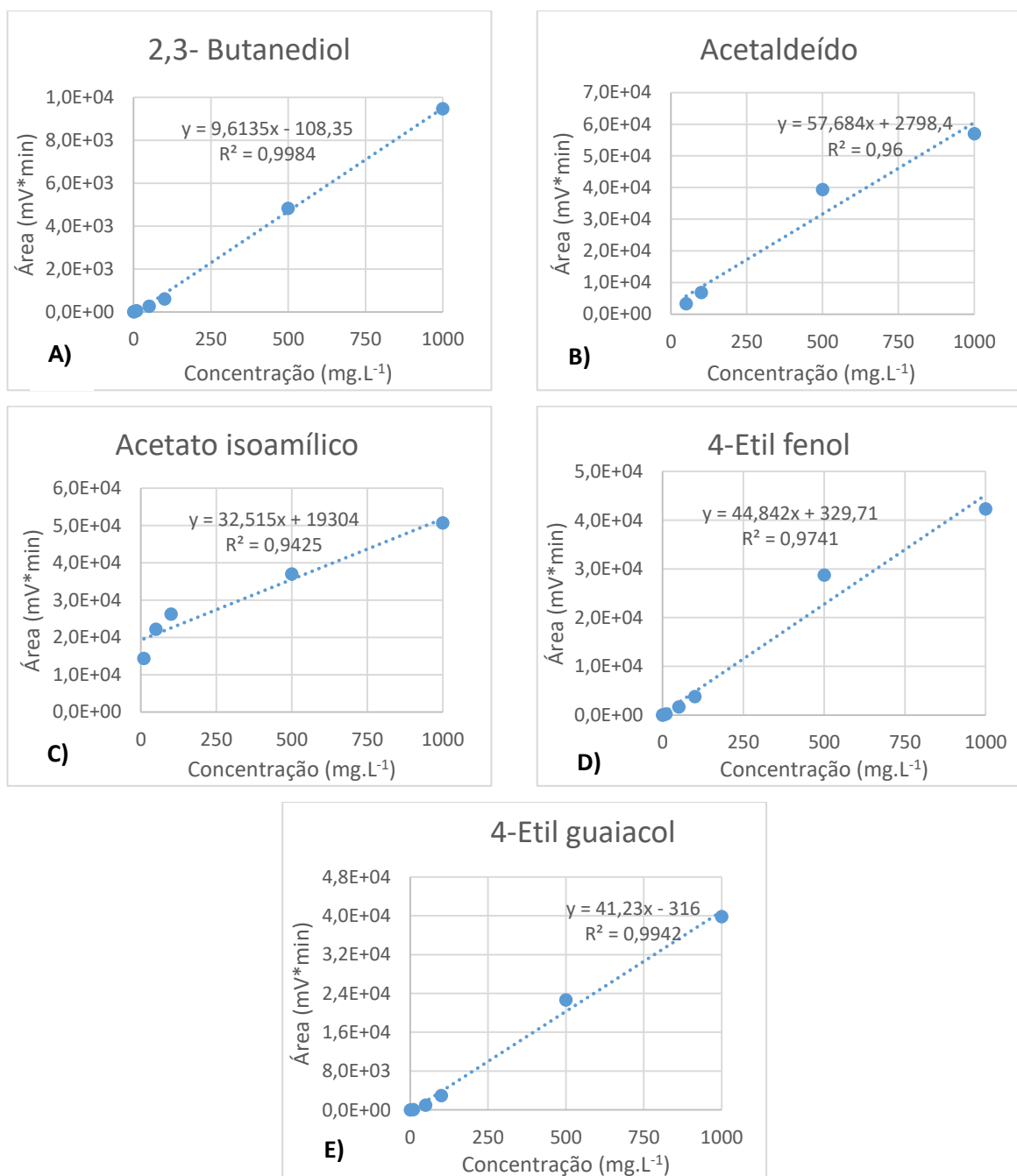


Figura 34- Curvas de calibração GC composto fenólicos e carbonilados. A) Curva de calibração 2,3-Butanediol; B) Curva de calibração acetaldeído; C) Curva de calibração acetato isoamílico; D) Curva de calibração 4- Etil fenol; E) Curva de calibração 4- Etil guaiacol.

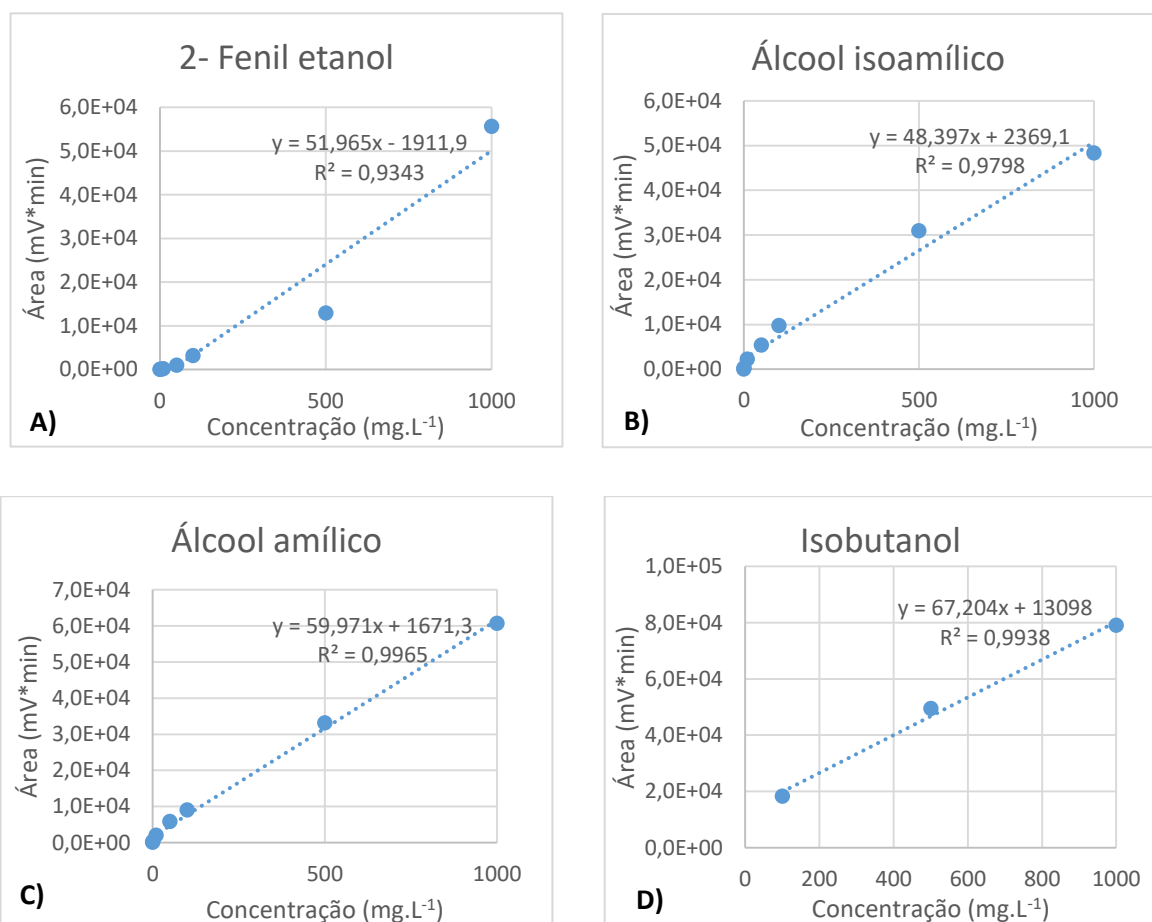


Figura 35- Curvas de calibração GC de álcoois superiores. A) Curva de calibração 2- Fenil etanol; B) Curva de calibração álcool isoamílico; C) Curva de calibração álcool amílico; D) Curva de calibração isobutanol.

Tabela 24- Tempos de retenção de compostos voláteis de interesse GC

Composto	Tempo de retenção (min)
2- Fenil etanol	10,46
Alcool isoamílico	3,06
2,3- Butanediol	6,61
Isobutanol	2,27
Alcool amílico	2,97
Acetaldeído	2,29
Acetato isoamílico	2,49
4- Etil fenol	12,76
4- Etil guaiacol	11,50

Anexo IV: Ficha de prova sensorial

Ocupação _____ Idade _____ Sexo _____

Amostra (código): _____

0- Não gosta nada; 1- gosta pouco; 2- gosta ligeiramente; 3- gosta moderadamente; 4- gosta muito; 5- gosta muitíssimo

Aparência (0-5) _____

Claridade: Translúcido, claro, ligeira turbidez, turvo, opaco

Retenção de espuma: nenhuma, pouca (até 15s), moderada (15-60s), ideal (mais de 60s)

Carbonatação (visual): pouca, moderada, ideal, excessiva.

Aroma (0-5) _____ (Circundar descritores mais evidentes e ordenar por intensidade)

Malte: pão, biscoito, caramelo, torrado, chocolate, café.

Lúpulo: Cítrico, tropical, frutado, floral, herbáceo, pinho, madeira.

Outros: Maçã, fruta verde, banana, pastilha elástica, cravinho, pêra, pêssego, ananás, framboesa, maracujá, manga, rosas, relva, fumado, amêndoas, toffee, manteiga, mel, nozes, canela, medicinal, solvente, queijo, vinagre, baunilha, pimenta, gengibre, couve cozida, leite azedo.

Palato (0-5) _____

Adstringência: baixa, média, elevada.

Corpo: Águada, suave, pleno.

Carbonatação: ausente (morta), ligeiramente carbonatada, carbonatada.

Final de boca: rápido (até 15s), médio (15-60 s), prolongado (mais de 60 s)

Flavor (0-5) _____

Alcool: não detectável, suave, forte, excessivo.

Doçura: suave, moderada, forte, excessiva

Acidez: suave, moderada, forte, excessiva

Amargor: suave, moderado, forte, excessivo.

Drinkability: (0-5) _____

Adequado ao estilo de cerveja: Sim/Não

Intenção de compra: (0-5)(sendo 5 – De certeza que compraria 4 – Provavelmente compraria 3 – Não sei se compraria 2 – Provavelmente não compraria 1 – De certeza que não compraria) _____

Classificação geral: (0-10) _____

Comentários: _____

Anexo V: Sequenciação levedura ISA1439

MG14+ITS1+ITS4	51	taattgctcccatgtgttttttattgaacaaatttctttggtggcgga	100
		. .	
Sc EB6 ITS1	1	----TGCACCACATGTGTTTTTATTGAACAAATTTCTTTGGTGGCGGGA	46
MG14+ITS1	101	gcaatcctaccgccagaggttataactaaaccaaactttttatttcagct	150
		.	
Sc EB6 ITS1	47	GCAATCCTACCGCCAGAGGTATAACTAAACCAAACTTTTATTACAGT	96
MG14+ITS1+ITS4	151	caaacttgatttattattacaatagtcaaaactttcaacaacggatctct	200
Sc EB6 ITS1	97	CAAACCTTGATTATTATTACAATAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCT	146
MG14+ITS1+ITS4	201	tggttctcgcacatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgatacgtaatatgaa	250
Sc EB6 ITS1	147	TGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGAA	196
MG14+ITS1+ITS4	251	ttgcagatatctcgtgaatcatcgaatctttgaacgcccattgcgccttt	300
		.	
Sc EB6 ITS1	197	TTGCAGATATTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTT	246
MG14+ITS1+ITS4	301	ggtattccaaagggcatgcctgtttgagcgtcatttctccctcaaacccc	350
Sc EB6 ITS1	247	GGTATTCCAAAGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCC	296
MG14+ITS1+ITS4	351	cgggtttggtgttgagcaatacgcctaggtttgttgaaagaatttaacgt	400
Sc EB6 ITS1	297	CGGGTTTGGTGTGAGCAATACGCTAGGTTTGTGTTGAAAGAATTTAACG-	345

Figura 36- Análise BLAST com alinhamento da região ITS1-ITS4 da estirpe ISA 1439 com a região ITS1 de *Saccharomyces cerevisiae* EB6

Anexo VI: Resultados tempos de retenção HPLC

Tabela 25- Tempos de retenção de compostos de interesse HPLC

Composto	Tempo de retenção (min)	
	Curvas de calibração	Amostras
Maltoriose	11,66	11,04
Maltose	11,92	11,85
Ácido cítrico	12,57	12,49
Glucose	13,59	13,64
Ácido málico	14,34	14,56
Ácido succínico	16,70	16,95
Ácido láctico	17,81	17,29
Glicerol	18,27	18,45
Ácido acético	19,79	19,74
Etanol	26,10	26,28

Tabela 26- Relação entre tempos de retenção dos compostos de interesse e padrão interno nas amostras dos ensaios Stout 1ª réplica

S1	Glucose		Maltose		Maltotriose		Glicerol		Etanol		Ácido cítrico		Ácido málico		Ácido láctico		Ácido succínico		Ácido acético	
	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.
RC	0,725 ^b	3,803 ^a	0,826 ^d	2,117 ^a	0,893 ^c	1,200 ^a	0,542 ^a	8,474 ^b	0,380 ^a	16,379 ^a	0,789 ^b	2,573 ^{ab}	0,691 ^a	4,313 ^c	0,557 ^c	7,688 ^a	0,593 ^a	6,634 ^c	0,499 ^b	9,716 ^{bc}
T0	0,723 ^b	3,826 ^a	0,822 ^d	2,167 ^a	0,890 ^c	1,231 ^{ab}	0,530 ^d	8,874 ^a	-	-	-	-	0,683 ^{bc}	4,650 ^a	0,577 ^a	7,328 ^b	-	-	0,504 ^a	9,828 ^a
T1	0,732 ^a	3,649 ^{bc}	0,828 ^d	2,073 ^a	0,894 ^c	1,188 ^{ab}	0,541 ^{bc}	8,458 ^{bc}	0,379 ^b	16,371 ^a	-	-	0,684 ^{bc}	4,609 ^{ab}	0,579 ^a	7,258 ^b	0,589 ^b	6,975 ^{ab}	0,505 ^a	9,807 ^a
T2	0,733 ^a	3,641 ^{bc}	0,842 ^c	1,872 ^b	0,898 ^{bc}	1,133 ^{bc}	0,542 ^{ab}	8,446 ^c	0,379 ^b	16,373 ^a	0,794 ^{ab}	2,600 ^a	0,685 ^{abc}	4,591 ^{ab}	0,579 ^a	7,251 ^b	0,588 ^{bc}	7,012 ^a	0,504 ^a	9,822 ^a
T3	0,730 ^a	3,693 ^b	0,845 ^{bc}	1,837 ^{bc}	0,903 ^b	1,072 ^{cd}	0,542 ^{abc}	8,439 ^c	0,379 ^b	16,354 ^a	0,799 ^a	2,505 ^{bc}	0,685 ^{abc}	4,579 ^{ab}	0,579 ^a	7,260 ^b	0,587 ^{bc}	7,009 ^a	0,505 ^a	9,782 ^{ab}
T4	0,730 ^a	3,686 ^{bc}	0,847 ^{bc}	1,806 ^c	0,909 ^a	1,005 ^{de}	0,542 ^{abc}	8,447 ^c	0,379 ^b	16,358 ^a	0,799 ^a	2,515 ^{bc}	0,679 ^c	4,716 ^{ab}	0,579 ^a	7,266 ^b	0,586 ^c	7,036 ^a	0,504 ^a	9,803 ^a
T5	0,731 ^a	3,669 ^{bc}	0,848 ^b	1,789 ^c	0,912 ^a	0,986 ^e	0,542 ^{abc}	8,443 ^c	0,379 ^b	16,352 ^a	0,800 ^a	2,495 ^{bc}	0,686 ^{abc}	4,566 ^{ab}	0,579 ^a	7,256 ^b	0,586 ^c	7,034 ^a	0,505 ^a	9,788 ^{ab}
T6	0,732 ^a	3,595 ^c	0,854 ^a	1,673 ^d	0,909 ^a	0,961 ^e	0,541 ^c	8,308 ^d	0,377 ^c	16,168 ^b	0,797 ^a	2,490 ^c	0,686 ^a	4,474 ^c	0,560 ^b	7,706 ^a	0,586 ^c	6,922 ^b	0,504 ^a	9,646 ^c

Legenda: CC – Curvas de Calibração. T0 a T6 (0-168h) – momentos do ensaio fermentativo. Letras diferentes dentro da mesma coluna correspondem a valores médios significativamente distintos (p<0,05). Valores sublinhados dentro da mesma coluna não diferem significativamente do valor médio padrão RC.

Tabela 27- Relação entre tempos de retenção dos compostos de interesse e padrão interno nas amostras dos ensaios Stout 2ª réplica

S2	Glucose		Maltose		Maltotriose		Glicerol		Etanol		Ácido cítrico		Ácido málico		Ácido láctico		Ácido succínico		Ácido acético	
	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.
CC	0,723 ^d	3,834 ^a	0,826 ^c	2,117 ^a	0,893 ^{cd}	1,200 ^a	0,542 ^a	8,474 ^b	0,380 ^a	16,379 ^{ab}	0,789 ^{cd}	2,573 ^{ab}	0,691 ^a	4,313 ^f	0,557 ^a	7,688 ^c	0,593 ^a	6,634 ^c	0,499 ^{bc}	9,716 ^b
T0	0,726 ^d	3,669 ^{bc}	0,825 ^c	2,057 ^{ab}	0,892 ^{cd}	1,182 ^a	0,543 ^a	8,196 ^c	-	-	-	-	0,685 ^{bc}	4,462 ^{cd}	0,557 ^a	7,723 ^{bc}	0,595 ^{ab}	6,620 ^c	0,501 ^{ab}	9,675 ^b
T1	0,723 ^d	3,686 ^{bc}	0,823 ^c	2,071 ^{ab}	0,889 ^d	1,198 ^a	0,540 ^b	8,216 ^c	0,377 ^a	15,900 ^c	-	-	0,682 ^e	4,495 ^b	0,555 ^b	7,742 ^b	0,591 ^{ab}	6,679 ^{bc}	0,497 ^{bc}	9,745 ^b
T2	0,726 ^d	3,637 ^c	0,824 ^c	2,065 ^{ab}	0,890 ^d	1,197 ^a	0,540 ^b	8,213 ^c	0,377 ^a	15,963 ^{bc}	0,797 ^{ab}	2,467 ^b	0,682 ^e	4,497 ^b	0,554 ^b	7,748 ^b	0,591 ^{ab}	6,683 ^{bc}	0,498 ^{bc}	9,734 ^b
T3	0,728 ^{cd}	3,610 ^{cd}	0,827 ^c	2,013 ^b	0,890 ^d	1,186 ^a	0,540 ^b	8,208 ^c	0,376 ^a	15,995 ^{bc}	0,787 ^{cd}	2,620 ^a	0,682 ^e	4,487 ^{bc}	0,555 ^b	7,740 ^b	0,591 ^{ab}	6,681 ^{bc}	0,499 ^{bc}	9,698 ^b
T4	0,729 ^{bcd}	3,585 ^{cde}	0,826 ^c	2,029 ^b	0,889 ^d	1,200 ^a	0,539 ^b	8,228 ^c	0,375 ^a	16,017 ^{bc}	0,784 ^{cd}	2,645 ^a	0,682 ^e	4,486 ^{bc}	0,553 ^b	7,774 ^b	0,589 ^b	6,704 ^{bc}	0,497 ^c	9,748 ^b
T5	0,734 ^{abc}	3,491 ^{def}	0,828 ^c	2,008 ^b	0,891 ^d	1,180 ^a	0,540 ^b	8,214 ^c	0,376 ^a	15,995 ^{bc}	0,791 ^{bc}	2,552 ^{ab}	0,683 ^{de}	4,479 ^{bc}	0,554 ^b	7,745 ^b	0,590 ^{ab}	6,690 ^{bc}	0,498 ^{bc}	9,733 ^b
T6	0,734 ^{abc}	3,496 ^{def}	0,837 ^b	1,881 ^c	0,893 ^{cd}	1,161 ^{ab}	0,540 ^b	8,208 ^c	0,382 ^a	15,666 ^c	0,789 ^{cd}	2,583 ^a	0,684 ^{cd}	4,456 ^{cde}	0,555 ^b	7,745 ^b	0,591 ^{ab}	6,678 ^{bc}	0,498 ^{bc}	9,714 ^b
T7	0,735 ^{ab}	3,476 ^{ef}	0,844 ^{ab}	1,782 ^{de}	0,897 ^{bc}	1,105 ^b	0,540 ^b	8,203 ^c	0,377 ^a	15,976 ^{bc}	0,785 ^{cd}	2,639 ^a	0,685 ^c	4,442 ^{de}	0,555 ^b	7,748 ^b	0,589 ^b	6,731 ^b	0,498 ^{bc}	9,730 ^b
T8	0,737 ^a	3,445 ^f	0,844 ^{ab}	1,787 ^{de}	0,901 ^{ab}	1,056 ^{cd}	0,540 ^b	8,218 ^c	0,376 ^a	15,983 ^{bc}	0,784 ^{cd}	2,656 ^a	0,685 ^c	4,443 ^{de}	0,554 ^b	7,749 ^b	0,589 ^b	6,743 ^b	0,498 ^{bc}	9,718 ^b
T9	0,738 ^a	3,428 ^f	0,846 ^a	1,752 ^e	0,903 ^a	1,038 ^d	0,540 ^b	8,220 ^c	0,376 ^a	15,983 ^{bc}	0,784 ^d	2,661 ^a	0,685 ^c	4,429 ^e	0,554 ^b	7,754 ^b	0,588 ^b	6,743 ^b	0,498 ^{bc}	9,726 ^b
T10	0,730 ^{bcd}	3,789 ^{ab}	0,847 ^a	1,855 ^{cd}	0,904 ^a	1,082 ^{cd}	0,543 ^a	8,606 ^a	0,380 ^a	16,671 ^a	0,798 ^a	2,594 ^a	0,688 ^b	4,647 ^a	0,558 ^a	8,178 ^a	0,591 ^{ab}	7,076 ^a	0,504 ^a	10,059 ^a
Legenda: CC – Curvas de Calibração. T0 a T10 (0-170h) – momentos do ensaio fermentativo. Letras diferentes dentro da mesma coluna correspondem a valores médios significativamente distintos (p<0,05). Valores sublinhados dentro da mesma coluna não diferem significativamente do valor médio padrão CC.																				

Tabela 28- Relação entre tempos de retenção dos compostos de interesse e padrão interno nas amostras dos ensaios Weiss 1ª réplica

W1	Glucose		Maltose		Maltotriose		Glicerol		Etanol		Ácido cítrico		Ácido málico		Ácido láctico		Ácido succínico		Ácido acético	
	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.
CC	<u>0,723</u> ^c	<u>3,834</u> ^a	<u>0,826</u> ^d	<u>2,117</u> ^a	<u>0,893</u> ^{bc}	<u>1,200</u> ^{ab}	<u>0,542</u> ^c	<u>8,474</u> ^a	<u>0,380</u> ^b	<u>16,379</u> ^a	<u>0,789</u> ^b	<u>2,573</u> ^a	<u>0,691</u> ^a	<u>4,313</u> ^d	<u>0,557</u> ^b	<u>7,688</u> ^f	<u>0,593</u> ^{de}	<u>6,634</u> ^c	<u>0,499</u> ^c	<u>9,716</u> ^c
T0	0,729 ^b	<u>3,796</u> ^a	<u>0,826</u> ^d	<u>2,144</u> ^a	<u>0,892</u> ^c	<u>1,233</u> ^a	0,554 ^a	8,219 ^{bc}	-	-	-	-	0,688 ^b	4,638 ^a	0,565 ^a	7,873 ^{cd}	0,598 ^{bc}	6,871 ^a	0,506 ^a	9,960 ^b
T1	0,728 ^b	<u>3,771</u> ^a	<u>0,826</u> ^d	<u>2,120</u> ^a	<u>0,894</u> ^{bc}	<u>1,196</u> ^{ab}	0,552 ^a	8,201 ^c	0,384 ^a	16,179 ^b	-	-	0,686 ^{bc}	4,620 ^{ab}	0,567 ^a	<u>7,713</u> ^{ef}	<u>0,594</u> ^{cde}	6,905 ^a	0,502 ^b	9,998 ^{ab}
T2	<u>0,728</u> ^{bc}	<u>3,767</u> ^a	<u>0,825</u> ^d	<u>2,138</u> ^a	<u>0,893</u> ^c	<u>1,212</u> ^a	0,548 ^b	8,300 ^b	<u>0,380</u> ^b	<u>16,469</u> ^a	-	-	0,685 ^c	4,634 ^{ab}	0,564 ^a	7,792 ^{de}	0,600 ^b	6,711 ^b	0,501 ^b	10,033 ^a
T3	0,743 ^a	3,479 ^c	<u>0,826</u> ^d	<u>2,122</u> ^a	<u>0,893</u> ^{bc}	<u>1,207</u> ^{ab}	<u>0,545</u> ^c	<u>8,422</u> ^a	<u>0,379</u> ^{bc}	<u>16,482</u> ^a	-	-	0,685 ^{bc}	4,618 ^{ab}	<u>0,555</u> ^b	8,067 ^{ab}	0,605 ^a	<u>6,587</u> ^c	0,502 ^b	9,982 ^{ab}
T4	0,743 ^a	3,476 ^c	<u>0,827</u> ^d	<u>2,109</u> ^a	<u>0,893</u> ^{bc}	<u>1,206</u> ^{ab}	<u>0,544</u> ^c	<u>8,455</u> ^a	<u>0,379</u> ^{bc}	<u>16,486</u> ^a	-	-	0,686 ^{bc}	4,625 ^{ab}	<u>0,556</u> ^b	8,026 ^{bc}	0,600 ^b	6,711 ^b	0,502 ^b	9,992 ^{ab}
T5	0,744 ^a	3,472 ^c	0,836 ^c	1,974 ^b	<u>0,895</u> ^{bc}	<u>1,182</u> ^{ab}	<u>0,543</u> ^c	<u>8,464</u> ^a	<u>0,379</u> ^b	<u>16,473</u> ^a	0,797 ^a	<u>2,562</u> ^{ab}	0,685 ^{bc}	4,616 ^{ab}	<u>0,557</u> ^b	8,006 ^{bc}	<u>0,595</u> ^{cd}	6,860 ^a	0,502 ^b	9,973 ^{ab}
T6	0,742 ^a	3,500 ^c	0,850 ^b	1,776 ^c	<u>0,899</u> ^b	<u>1,133</u> ^b	<u>0,544</u> ^c	<u>8,462</u> ^a	<u>0,380</u> ^b	<u>16,468</u> ^a	0,798 ^a	<u>2,547</u> ^{ab}	0,686 ^{bc}	4,615 ^{ab}	<u>0,557</u> ^b	7,998 ^{bc}	<u>0,595</u> ^{cd}	6,864 ^a	0,502 ^b	9,977 ^{ab}
T7	0,743 ^a	3,479 ^c	0,854 ^a	1,723 ^d	0,909 ^a	1,012 ^c	<u>0,543</u> ^c	<u>8,481</u> ^a	<u>0,379</u> ^b	<u>16,485</u> ^a	0,799 ^a	<u>2,531</u> ^{ab}	0,686 ^{bc}	4,615 ^{ab}	<u>0,557</u> ^b	8,017 ^{bc}	<u>0,595</u> ^{cd}	6,868 ^a	0,502 ^b	9,995 ^{ab}
T8	0,742 ^a	3,502 ^c	0,854 ^a	1,722 ^d	0,911 ^a	0,980 ^c	<u>0,543</u> ^c	<u>8,474</u> ^a	<u>0,379</u> ^b	<u>16,474</u> ^a	0,800 ^a	<u>2,520</u> ^{ab}	0,686 ^{bc}	4,612 ^b	<u>0,557</u> ^b	7,994 ^{bc}	<u>0,594</u> ^{cd}	6,881 ^a	0,502 ^b	9,992 ^{ab}
T9	0,732 ^b	3,627 ^b	0,849 ^b	1,767 ^{cd}	0,909 ^a	0,996 ^c	0,554 ^a	7,989 ^d	0,377 ^c	<u>16,433</u> ^a	0,800 ^a	2,484 ^b	0,686 ^{bc}	4,544 ^c	0,550 ^c	8,132 ^a	<u>0,591</u> ^e	6,868 ^a	<u>0,499</u> ^c	9,965 ^a
Legenda: CC – Curvas de Calibração. T0 a T9 (0-167h) – momentos do ensaio fermentativo. Letras diferentes dentro da mesma coluna correspondem a valores médios significativamente distintos (p<0,05). Valores sublinhados dentro da mesma coluna não diferem significativamente do valor médio padrão CC.																				

Tabela 29- Relação entre tempos de retenção dos compostos de interesse e padrão interno nas amostras dos ensaios Weiss 2ª réplica

W2	Glucose		Maltose		Maltotriose		Glicerol		Etanol		Ácido cítrico		Ácido málico		Ácido láctico		Ácido succínico		Ácido acético	
	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.
CC	0,728^{cd}	3,695^{ab}	0,828^{cd}	2,053^{bc}	0,895^{de}	1,252^a	0,546^{bc}	8,302^b	0,381^a	16,169^b	0,788^c	2,654^a	0,693^a	4,415^b	0,560^b	7,818^b	0,597^a	6,736^b	0,502^b	9,853^a
T0	<u>0,725^d</u>	<u>3,954^a</u>	<u>0,824^d</u>	<u>2,231^a</u>	<u>0,891^e</u>	<u>1,270^a</u>	0,567 ^a	<u>7,949^b</u>	-	-	-	-	<u>0,691^a</u>	<u>4,656^{ab}</u>	-	-	-	-	<u>0,508^{ab}</u>	<u>10,109^a</u>
T1	<u>0,734^{bcd}</u>	<u>3,863^{ab}</u>	<u>0,828^{cd}</u>	<u>2,215^{ab}</u>	<u>0,896^{cde}</u>	<u>1,231^{ab}</u>	<u>0,561^{ab}</u>	<u>8,352^b</u>	<u>0,386^a</u>	16,918 ^a	-	-	<u>0,691^a</u>	4,769 ^a	-	-	<u>0,589^a</u>	7,447 ^a	<u>0,511^{ab}</u>	<u>10,189^a</u>
T2	<u>0,738^{abcd}</u>	<u>3,787^{ab}</u>	<u>0,832^{cd}</u>	<u>2,155^{abc}</u>	<u>0,899^{bcde}</u>	<u>1,202^{abc}</u>	<u>0,560^{abc}</u>	<u>8,397^b</u>	<u>0,383^a</u>	17,1919 ^a	-	-	<u>0,692^a</u>	4,758 ^a	<u>0,563^{ab}</u>	<u>8,086^{ab}</u>	<u>0,607^a</u>	<u>6,884^{ab}</u>	0,517 ^a	<u>10,022^a</u>
T3	<u>0,741^{abc}</u>	<u>3,703^{ab}</u>	<u>0,831^{cd}</u>	<u>2,149^{abc}</u>	<u>0,899^{bcde}</u>	<u>1,189^{abc}</u>	<u>0,545^c</u>	8,848 ^a	<u>0,381^a</u>	17,237 ^a	-	-	<u>0,694^a</u>	4,681 ^a	<u>0,566^{ab}</u>	<u>8,071^{ab}</u>	<u>0,608^a</u>	<u>6,839^{ab}</u>	<u>0,512^{ab}</u>	<u>10,140^a</u>
T4	0,746 ^{ab}	<u>3,606^b</u>	<u>0,839^{bc}</u>	<u>2,027^{cd}</u>	<u>0,901^{bcde}</u>	<u>1,160^{abcd}</u>	<u>0,548^{bc}</u>	8,751 ^a	<u>0,383^a</u>	17,097 ^a	-	-	<u>0,692^a</u>	4,714 ^a	<u>0,567^{ab}</u>	<u>8,077^{ab}</u>	<u>0,611^a</u>	<u>6,744^b</u>	0,515 ^a	<u>9,986^a</u>
T5	0,746 ^{ab}	<u>3,636^b</u>	0,850 ^{ab}	1,873 ^{de}	<u>0,905^{abcd}</u>	1,124 ^{bcd}	<u>0,547^{bc}</u>	8,832 ^a	<u>0,383^a</u>	17,184 ^a	0,800 ^b	<u>2,658^a</u>	<u>0,691^a</u>	4,776 ^a	<u>0,568^{ab}</u>	<u>8,086^{ab}</u>	<u>0,609^a</u>	<u>6,850^{ab}</u>	0,516 ^a	<u>10,026^a</u>
T6	0,747 ^{ab}	<u>3,639^b</u>	0,853 ^a	1,852 ^e	0,906 ^{abc}	1,110 ^{bcd}	<u>0,549^{bc}</u>	8,822 ^a	<u>0,384^a</u>	17,172 ^a	0,802 ^{ab}	<u>2,639^a</u>	<u>0,694^a</u>	4,737 ^a	0,577 ^a	<u>7,866^{ab}</u>	<u>0,606^a</u>	<u>7,029^{ab}</u>	0,517 ^a	<u>10,021^a</u>
T7	0,749 ^a	<u>3,613^b</u>	0,855 ^a	1,851 ^e	0,913 ^{ab}	1,052 ^d	<u>0,549^{bc}</u>	8,811 ^a	<u>0,385^a</u>	17,078 ^a	0,805 ^{ab}	<u>2,629^a</u>	<u>0,694^a</u>	4,741 ^a	<u>0,564^{ab}</u>	8,290 ^a	<u>0,611^a</u>	<u>6,846^{ab}</u>	0,516 ^a	<u>10,058^a</u>
T8	0,748 ^{ab}	<u>3,588^b</u>	0,857 ^a	1,782 ^e	0,907 ^a	1,094 ^{cd}	<u>0,548^{bc}</u>	8,795 ^a	<u>0,382^a</u>	17,202 ^a	0,809 ^a	2,518 ^b	<u>0,694^a</u>	4,700 ^a	<u>0,569^{ab}</u>	<u>8,057^{ab}</u>	<u>0,609^a</u>	<u>6,830^{ab}</u>	<u>0,514^{ab}</u>	<u>10,083^a</u>

Legenda: CC – Curvas de Calibração. T0 a T8 (0-174h) – momentos do ensaio fermentativo. Letras diferentes dentro da mesma coluna correspondem a valores médios significativamente distintos (p<0,05). Valores sublinhados dentro da mesma coluna não diferem significativamente do valor médio padrão CC.

Tabela 30- Relação entre tempos de retenção dos compostos de interesse e padrão interno nas amostras dos ensaios *Dunkel* 1ª réplica

D1	Glucose		Maltose		Maltotriose		Glicerol		Etanol		Ácido cítrico		Ácido málico		Ácido láctico		Ácido succínico		Ácido acético	
	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.
CC	0,728^c	3,724^b	0,828^{de}	2,112^{abc}	0,895^{ab}	1,252^b	0,546^c	8,302^{abcd}	0,381^b	16,169^a	0,788^c	2,654^a	0,693^a	4,415^d	0,560^{bc}	0,560^{bc}	0,597^b	6,736^{de}	0,502^b	9,853^{abc}
T0	<u>0,727^c</u>	3,932 ^a	<u>0,825^e</u>	<u>2,216^s</u>	0,882 ^c	1,391 ^a	0,557 ^a	<u>8,337^{abcd}</u>	-	-	-	-	0,687 ^b	4,774 ^a	0,571 ^a	0,571 ^a	0,588 ^c	7,338 ^a	0,509 ^a	<u>10,102^a</u>
T1	<u>0,727^c</u>	<u>3,805^{ab}</u>	<u>0,826^e</u>	<u>2,131^{sb}</u>	<u>0,893^{bc}</u>	<u>1,214^{bc}</u>	0,553 ^a	<u>8,184^d</u>	<u>0,383^{ab}</u>	<u>16,407^a</u>	-	-	0,687 ^b	4,622 ^{ab}	<u>0,568^{abc}</u>	<u>0,568^{abc}</u>	0,589 ^c	7,072 ^{ab}	<u>0,507^{ab}</u>	<u>9,869^{ab}</u>
T2	<u>0,727^c</u>	<u>3,785^{ab}</u>	<u>0,827^e</u>	<u>2,117^{sbc}</u>	<u>0,893^{bc}</u>	<u>1,205^{bc}</u>	0,553 ^a	<u>8,166^d</u>	<u>0,382^{ab}</u>	<u>16,308^a</u>	-	-	0,687 ^b	4,601 ^{ab}	<u>0,569^{ab}</u>	<u>0,569^{ab}</u>	<u>0,592^{bc}</u>	6,954 ^{bc}	<u>0,507^{ab}</u>	<u>9,825^{abcd}</u>
T3	<u>0,728^c</u>	<u>3,775^{ab}</u>	<u>0,830^{de}</u>	<u>2,062^{bcd}</u>	<u>0,894^{ab}</u>	<u>1,192^{bc}</u>	0,550 ^{ab}	<u>8,252^{cd}</u>	<u>0,383^{ab}</u>	<u>16,302^a</u>	0,801 ^{ab}	<u>2,558^{abc}</u>	0,687 ^b	4,595 ^{abc}	<u>0,564^{abc}</u>	<u>0,564^{abc}</u>	<u>0,594^{bc}</u>	<u>6,891^{cd}</u>	0,508 ^a	<u>9,776^{abcd}</u>
T4	<u>0,728^c</u>	<u>3,769^{ab}</u>	<u>0,831^{de}</u>	<u>2,050^{bcd}</u>	<u>0,897^{ab}</u>	<u>1,157^{bcd}</u>	0,550 ^{ab}	<u>8,264^{bcd}</u>	<u>0,382^{ab}</u>	<u>16,329^a</u>	0,802 ^{ab}	<u>2,546^{abc}</u>	0,687 ^b	4,601 ^{ab}	<u>0,569^{ab}</u>	<u>0,569^{ab}</u>	<u>0,593^{bc}</u>	6,943 ^{bc}	0,508 ^a	<u>9,792^{abcd}</u>
T5	<u>0,729^{bc}</u>	<u>3,753^{ab}</u>	<u>0,832^{de}</u>	<u>2,046^{bcd}</u>	<u>0,897^{ab}</u>	<u>1,165^{bcd}</u>	<u>0,547^{bc}</u>	<u>8,361^{abc}</u>	<u>0,382^{ab}</u>	<u>16,340^a</u>	0,802 ^{ab}	<u>2,552^{abc}</u>	0,687 ^b	4,609 ^{ab}	<u>0,558^c</u>	<u>0,558^c</u>	<u>0,594^{bc}</u>	6,920 ^{bc}	0,507 ^a	<u>9,813^{abcd}</u>
T6	<u>0,731^{bc}</u>	<u>3,733^b</u>	<u>0,831^{de}</u>	<u>2,064^{abcd}</u>	<u>0,896^{ab}</u>	<u>1,171^{bcd}</u>	<u>0,547^c</u>	<u>8,399^{abc}</u>	<u>0,382^{ab}</u>	<u>16,365^a</u>	0,802 ^{ab}	<u>2,562^{abc}</u>	0,686 ^b	4,613 ^{ab}	<u>0,559^{bc}</u>	<u>0,559^{bc}</u>	<u>0,595^{bc}</u>	<u>6,920^{cd}</u>	0,509 ^a	<u>9,777^{abcd}</u>
T7	<u>0,732^{bc}</u>	<u>3,703^b</u>	<u>0,831^{de}</u>	<u>2,064^{abcd}</u>	<u>0,896^{ab}</u>	<u>1,174^{bcd}</u>	<u>0,546^c</u>	<u>8,428^a</u>	<u>0,382^{ab}</u>	<u>16,387^a</u>	0,802 ^a	<u>2,550^{abc}</u>	0,687 ^b	4,630 ^{ab}	<u>0,560^{bc}</u>	<u>0,560^{bc}</u>	<u>0,592^{bc}</u>	6,900 ^{bc}	0,507 ^a	<u>9,829^{abcd}</u>
T8	0,736 ^b	<u>3,640^b</u>	<u>0,832^{de}</u>	<u>2,044^{bcd}</u>	<u>0,897^{ab}</u>	<u>1,166^{bcd}</u>	<u>0,546^c</u>	<u>8,411^{ab}</u>	<u>0,382^{ab}</u>	<u>16,372^a</u>	0,803 ^a	2,515 ^{bc}	0,686 ^b	4,621 ^{ab}	-	-	<u>0,593^{bc}</u>	6,981 ^{bc}	0,509 ^a	<u>9,761^{abcd}</u>
T9	<u>0,732^{bc}</u>	<u>3,694^b</u>	<u>0,837^{cde}</u>	<u>1,969^{cde}</u>	<u>0,898^{ab}</u>	<u>1,143^{bcd}</u>	<u>0,545^c</u>	<u>8,419^{ab}</u>	<u>0,382^{ab}</u>	<u>16,359^a</u>	0,806 ^b	<u>2,626^{bc}</u>	0,687 ^b	4,616 ^{ab}	-	-	<u>0,594^{bc}</u>	<u>6,952^{cd}</u>	0,509 ^a	<u>9,732^{abcd}</u>
T10	<u>0,731^{bc}</u>	<u>3,712^b</u>	<u>0,839^{bcd}</u>	1,938 ^{def}	<u>0,900^{ab}</u>	1,127 ^{cd}	<u>0,546^c</u>	<u>8,402^{abc}</u>	<u>0,382^{ab}</u>	<u>16,334^a</u>	0,796 ^{ab}	<u>2,541^{ab}</u>	0,687 ^b	4,600 ^{ab}	-	-	<u>0,595^{bc}</u>	<u>6,887^{cd}</u>	0,511 ^a	9,667 ^d
T11	<u>0,731^{bc}</u>	<u>3,716^b</u>	0,844 ^{abc}	1,863 ^{efg}	<u>0,899^{ab}</u>	<u>1,130^{bcd}</u>	<u>0,546^c</u>	<u>8,397^{abc}</u>	<u>0,382^{ab}</u>	<u>16,321^a</u>	0,801 ^{ab}	2,524 ^{abc}	0,687 ^b	4,598 ^{ab}	-	-	<u>0,594^{bc}</u>	<u>6,875^{cd}</u>	0,511 ^a	<u>9,669^{cd}</u>
T12	<u>0,728^c</u>	<u>3,763^{ab}</u>	0,847 ^{abc}	1,821 ^{efg}	<u>0,899^{ab}</u>	<u>1,136^{bcd}</u>	<u>0,545^c</u>	<u>8,400^{abc}</u>	<u>0,382^{ab}</u>	<u>16,342^a</u>	0,800 ^{ab}	2,523 ^{bc}	0,687 ^b	4,601 ^{ab}	-	-	<u>0,594^{bc}</u>	<u>6,888^{cd}</u>	0,510 ^a	<u>9,690^{bcd}</u>
T13	<u>0,727^c</u>	<u>3,776^{ab}</u>	0,848 ^{abc}	1,808 ^{fgh}	<u>0,902^{ab}</u>	1,091 ^{cd}	<u>0,547^c</u>	<u>8,359^{abc}</u>	0,383 ^a	<u>16,241^a</u>	0,800 ^{ab}	2,513 ^{bc}	0,688 ^b	4,574 ^{bc}	-	-	<u>0,594^{bc}</u>	<u>6,886^{cd}</u>	0,510 ^a	9,665 ^d
T14	<u>0,727^c</u>	<u>3,780^{ab}</u>	0,851 ^{ab}	1,768 ^{gh}	<u>0,902^{ab}</u>	1,094 ^{cd}	<u>0,547^c</u>	<u>8,356^{abc}</u>	0,383 ^a	<u>16,234^a</u>	0,800 ^{ab}	2,524 ^{bc}	0,699 ^b	4,571 ^{bc}	-	-	<u>0,595^{bc}</u>	<u>6,879^{cd}</u>	0,510 ^a	9,659 ^d
T15	<u>0,728^c</u>	<u>3,763^{ab}</u>	0,851 ^{ab}	1,766 ^{gh}	<u>0,901^{ab}</u>	1,106 ^{cd}	<u>0,546^c</u>	<u>8,353^{abc}</u>	<u>0,383^{ab}</u>	<u>16,231^a</u>	0,801 ^{ab}	2,502 ^c	0,688 ^b	4,568 ^{bc}	-	-	<u>0,594^{bc}</u>	<u>6,862^{cd}</u>	0,510 ^a	9,669 ^d
T16	0,747 ^a	3,424 ^c	0,855 ^a	1,708 ^h	<u>0,905^a</u>	1,055 ^d	<u>0,545^c</u>	<u>8,407^{abc}</u>	<u>0,382^{ab}</u>	<u>16,287^a</u>	0,804 ^a	2,463 ^c	<u>0,691^a</u>	4,508 ^c	-	-	0,605 ^a	<u>6,593^e</u>	<u>0,506^{ab}</u>	<u>9,834^{abcd}</u>

Legenda: CC – Curvas de Calibração. T0 a T16 (0-330h) – momentos do ensaio fermentativo. Letras diferentes dentro da mesma coluna correspondem a valores médios significativamente distintos (p<0,05). Valores sublinhados dentro da mesma coluna não diferem significativamente do valor médio padrão CC.

Tabela 31- Relação entre tempos de retenção dos compostos de interesse e padrão interno nas amostras dos ensaios *Dunkel* 2ª réplica

D2	Glucose		Maltose		Maltotriose		Glicerol		Etanol		Ácido cítrico		Ácido málico		Ácido láctico		Ácido succínico		Ácido acético	
	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.	Rácio	Dif.
CC	<u>0,728</u> ^{efg h}	<u>3,725</u> ^{abc}	<u>0,828</u> ^{de}	<u>2,112</u> ^a	<u>0,895</u> ^{cdef}	<u>1,252</u> ^a	<u>0,546</u> ^{def}	<u>8,302</u> ^{abc}	<u>0,381</u> ^a	<u>16,169</u> ^a	<u>0,788</u> ^b	<u>2,654</u> ^a	<u>0,693</u> ^a	<u>4,415</u> ^b	<u>0,560</u> ^c	<u>7,818</u> ^a	<u>0,597</u> ^a	<u>6,736</u> ^{cde}	<u>0,502</u> ^e	<u>9,853</u> ^a
T0	<u>0,724</u> ^h	<u>3,769</u> ^{ab}	<u>0,823</u> ^e	<u>2,120</u> ^a	<u>0,889</u> ^f	<u>1,236</u> ^{ab}	<u>0,554</u> ^{ab}	7,990 ^{de}	-	-	-	-	0,684 ^b	4,585 ^a	<u>0,567</u> ^{ab}	<u>7,576</u> ^{bcd}	0,585 ^b	7,035 ^a	<u>0,504</u> ^{de}	<u>9,766</u> ^{ab}
T1	<u>0,724</u> ^h	<u>3,787</u> ^a	<u>0,824</u> ^e	<u>2,125</u> ^a	<u>0,891</u> ^{ef}	<u>1,223</u> ^{ab}	0,555 ^a	7,988 ^e	<u>0,382</u> ^a	<u>16,133</u> ^a	-	-	0,685 ^b	4,577 ^a	0,569 ^{abc}	7,543 ^{cd}	<u>0,590</u> ^{ab}	<u>6,925</u> ^{abc}	<u>0,504</u> ^{cde}	<u>9,795</u> ^{ab}
T2	<u>0,725</u> ^{gh}	<u>3,785</u> ^a	<u>0,824</u> ^e	<u>2,128</u> ^a	<u>0,891</u> ^f	<u>1,226</u> ^{ab}	0,553 ^{abc}	8,076 ^{de}	<u>0,381</u> ^a	<u>16,219</u> ^a	-	-	0,685 ^b	4,584 ^a	<u>0,568</u> ^{abc}	7,581 ^{bcd}	<u>0,590</u> ^{ab}	<u>6,923</u> ^{abc}	<u>0,505</u> ^{bcde}	<u>9,755</u> ^{ab}
T3	<u>0,726</u> ^{fg h}	<u>3,759</u> ^{ab}	<u>0,825</u> ^{de}	<u>2,114</u> ^a	<u>0,892</u> ^{ef}	<u>1,212</u> ^{abc}	<u>0,549</u> ^{bcd}	<u>8,180</u> ^{cd}	<u>0,381</u> ^a	<u>16,201</u> ^a	-	-	0,686 ^b	4,569 ^a	<u>0,568</u> ^{abc}	7,588 ^{bcd}	<u>0,591</u> ^{ab}	<u>6,908</u> ^{abcd}	<u>0,505</u> ^{abcde}	<u>9,753</u> ^{ab}
T4	<u>0,726</u> ^{fg h}	<u>3,759</u> ^{ab}	<u>0,825</u> ^{de}	<u>2,110</u> ^{ab}	<u>0,891</u> ^{ef}	<u>1,215</u> ^{abc}	<u>0,549</u> ^{cde}	<u>8,197</u> ^{bcd}	<u>0,381</u> ^a	<u>16,192</u> ^a	-	-	0,685 ^b	4,577 ^a	<u>0,567</u> ^{abc}	<u>7,611</u> ^{abcd}	<u>0,590</u> ^{ab}	<u>6,907</u> ^{abcd}	<u>0,506</u> ^{abcde}	<u>9,731</u> ^{abcd}
T5	<u>0,729</u> ^{de fgh}	<u>3,714</u> ^{abc}	<u>0,829</u> ^{de}	<u>2,062</u> ^{ab}	<u>0,893</u> ^{def}	<u>1,198</u> ^{abc}	<u>0,546</u> ^{def}	<u>8,289</u> ^{abc}	<u>0,381</u> ^a	<u>16,210</u> ^a	0,804 ^a	2,480 ^b	0,685 ^b	4,585 ^a	0,572 ^a	7,446 ^d	<u>0,590</u> ^{ab}	6,938 ^{ab}	<u>0,506</u> ^{abcde}	<u>9,741</u> ^{abc}
T6	0,734 ^{bc d}	<u>3,618</u> ^{cde}	<u>0,829</u> ^{de}	<u>2,056</u> ^{ab}	<u>0,895</u> ^{cdef}	<u>1,173</u> ^{abcd}	<u>0,545</u> ^{def}	<u>8,317</u> ^{ab}	<u>0,381</u> ^a	<u>16,201</u> ^a	0,803 ^a	2,493 ^b	0,685 ^b	4,586 ^a	0,569 ^{ab}	7,541 ^{cd}	<u>0,592</u> ^{ab}	<u>6,889</u> ^{abcd e}	<u>0,506</u> ^{abcde}	<u>9,744</u> ^{abc}
T7	0,736 ^{bc}	3,591 ^{de}	<u>0,830</u> ^{de}	<u>2,046</u> ^{ab}	<u>0,895</u> ^{cdef}	<u>1,166</u> ^{abcd}	<u>0,545</u> ^{def}	<u>8,326</u> ^a	<u>0,381</u> ^a	<u>16,193</u> ^a	0,804 ^a	2,479 ^b	0,685 ^b	4,583 ^a	-	-	<u>0,591</u> ^{ab}	<u>6,895</u> ^{abcd e}	0,507 ^{abcd}	<u>9,722</u> ^{abcde}
T8	0,737 ^b	3,557 ^e	<u>0,831</u> ^{de}	<u>2,033</u> ^{ab}	<u>0,896</u> ^{cdef}	<u>1,160</u> ^{abcd}	<u>0,545</u> ^{def}	<u>8,338</u> ^a	<u>0,381</u> ^a	<u>16,200</u> ^a	0,803 ^a	2,489 ^b	0,685 ^b	4,580 ^a	-	-	<u>0,593</u> ^a	<u>6,863</u> ^{abcd e}	0,507 ^{abcd}	9,712 ^{bcde}
T9	0,737 ^b	3,557 ^e	<u>0,834</u> ^{cd}	1,990 ^{bc}	<u>0,897</u> ^{cdef}	1,146 ^{bcd}	<u>0,545</u> ^{def}	<u>8,333</u> ^a	<u>0,382</u> ^a	<u>16,182</u> ^a	0,804 ^a	2,481 ^b	0,686 ^b	4,577 ^a	-	-	<u>0,595</u> ^a	<u>6,799</u> ^{bcde}	0,508 ^{abc}	9,667 ^{bcde}
T10	<u>0,732</u> ^{bc def}	<u>3,652</u> ^{bcde}	0,842 ^{bc}	2,879 ^{cd}	<u>0,899</u> ^{bcde}	1,124 ^{cde}	<u>0,545</u> ^{def}	<u>8,330</u> ^a	<u>0,381</u> ^a	<u>16,179</u> ^a	0,803 ^a	2,463 ^b	0,685 ^b	4,578 ^a	-	-	<u>0,596</u> ^a	<u>6,767</u> ^{bcde}	0,509 ^a	9,605 ^{bcdef}
T11	<u>0,731</u> ^{bc def}	<u>3,658</u> ^{bcde}	0,847 ^{ab}	1,805 ^{de}	<u>0,900</u> ^{bcd}	1,104 ^{de}	<u>0,544</u> ^{def}	<u>8,333</u> ^a	<u>0,381</u> ^a	<u>16,173</u> ^a	0,803 ^a	2,457 ^b	0,685 ^b	4,580 ^a	-	-	<u>0,595</u> ^a	<u>6,774</u> ^{bcde}	0,509 ^a	9,599 ^{def}
T12	<u>0,731</u> ^{cd efg}	<u>3,669</u> ^{abcd e}	0,846 ^{ab}	1,805 ^{de}	<u>0,902</u> ^{abc}	1,085 ^{de}	<u>0,545</u> ^{def}	<u>8,323</u> ^a	<u>0,381</u> ^a	<u>16,154</u> ^a	0,802 ^a	2,474 ^b	0,685 ^b	4,574 ^a	-	-	<u>0,592</u> ^a	<u>6,845</u> ^{bcde}	0,509 ^{ab}	9,617 ^{cdef}
T13	<u>0,730</u> ^{cd efgh}	<u>3,687</u> ^{abcd}	0,847 ^{ab}	1,797 ^{de}	0,906 ^{ab}	1,035 ^{ef}	<u>0,544</u> ^{def}	<u>8,334</u> ^a	<u>0,381</u> ^a	<u>16,182</u> ^a	0,801 ^a	2,484 ^b	0,685 ^b	4,579 ^a	-	-	<u>0,594</u> ^a	<u>6,814</u> ^{bcde}	0,509 ^a	9,599 ^{def}
T14	<u>0,733</u> ^{bc de}	<u>3,621</u> ^{cde}	0,850 ^{ab}	1,753 ^{de}	0,908 ^a	1,000 ^f	<u>0,544</u> ^{def}	<u>8,303</u> ^{abc}	<u>0,381</u> ^a	<u>16,133</u> ^a	0,801 ^a	2,484 ^b	0,686 ^b	4,545 ^a	<u>0,560</u> ^c	<u>7,763</u> ^{abc}	<u>0,596</u> ^a	<u>6,729</u> ^{de}	0,509 ^a	9,558 ^f
T15	<u>0,733</u> ^{bc de}	<u>3,615</u> ^{cde}	0,848 ^{ab}	1,772 ^{de}	0,909 ^a	0,995 ^f	<u>0,544</u> ^{ef}	<u>8,324</u> ^a	<u>0,380</u> ^a	<u>16,152</u> ^a	0,801 ^a	2,451 ^b	0,685 ^b	4,557 ^a	<u>0,560</u> ^c	<u>7,776</u> ^{ab}	<u>0,593</u> ^a	<u>6,790</u> ^{bcde}	0,508 ^{abc}	9,590 ^{ef}
T16	0,744 ^a	3,411 ^f	0,853 ^a	1,712 ^e	0,905 ^{ab}	1,039 ^{ef}	<u>0,543</u> ^f	<u>8,340</u> ^a	<u>0,381</u> ^a	<u>16,153</u> ^a	0,801 ^a	2,465 ^b	0,685 ^b	4,562 ^a	<u>0,562</u> ^{bc}	<u>7,745</u> ^{abc}	<u>0,597</u> ^a	<u>6,713</u> ^e	0,507 ^{abcd}	9,662 ^{bcdef}

Legenda: CC – Curvas de Calibração. T0 a T16 (0-327h) – momentos do ensaio fermentativo. Letras diferentes dentro da mesma coluna correspondem a valores médios significativamente distintos (p<0,05). Valores sublinhados dentro da mesma coluna não diferem significativamente do valor médio padrão CC.

Anexo VII: Resultados individuais da evolução da microbiota

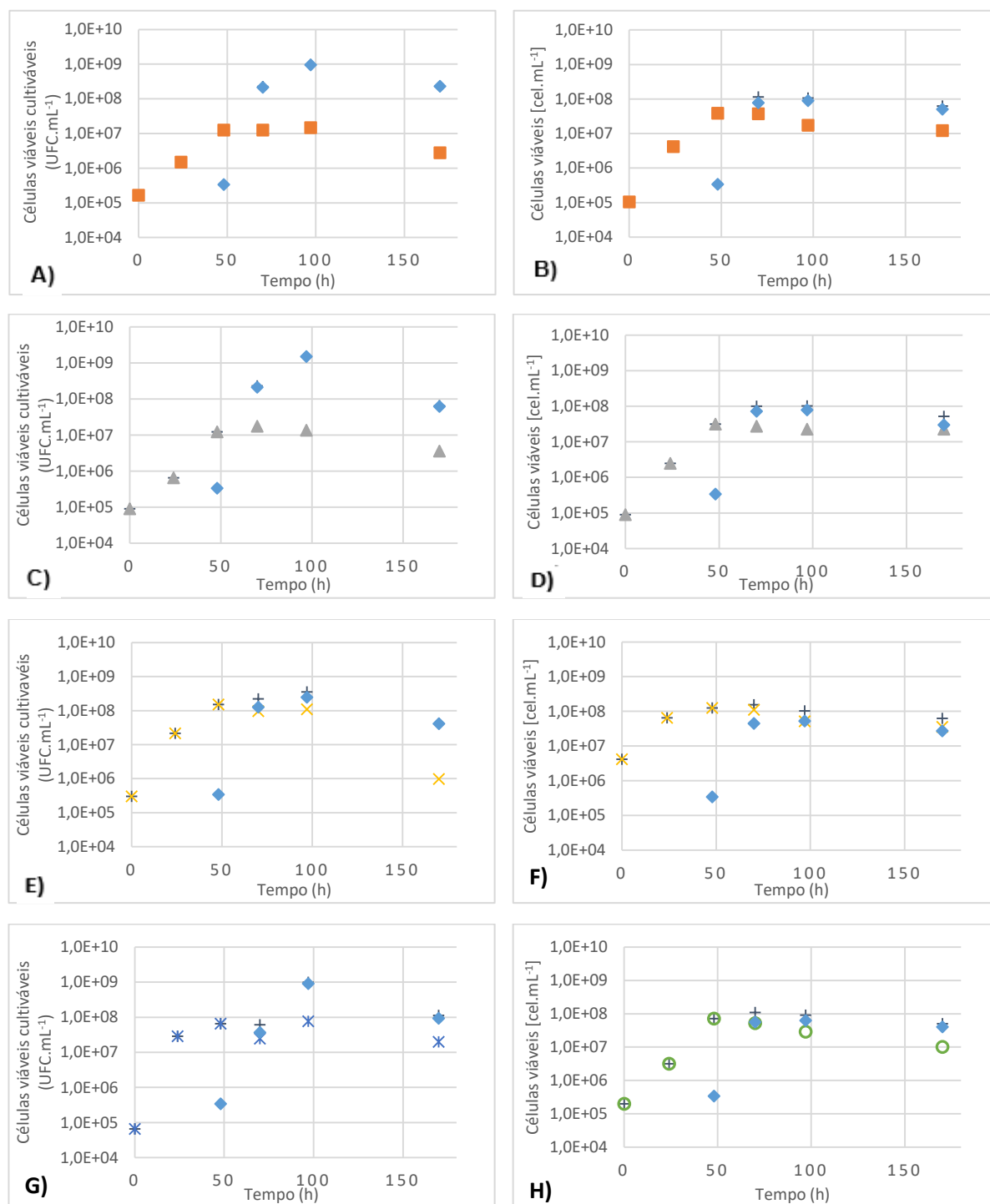


Figura 37- Curvas de crescimento de ensaios individuais em mosto Stout. A) e B) Evolução microbiota ensaios *D. bruxellensis* DL; C) e D) Evolução microbiota ensaios *D. bruxellensis* DS; E) e F) Evolução microbiota ensaios *K. apiculata*; G) Evolução microbiota ensaio *S. cerevisiae* não-comercial P; H) Evolução microbiota ensaio *T. delbrueckii*. Símbolos: (+) Total; (♦) Co-inóculo S-04; (■) DL; (▲) DS; (✱) K; (✕) P; (○) T.

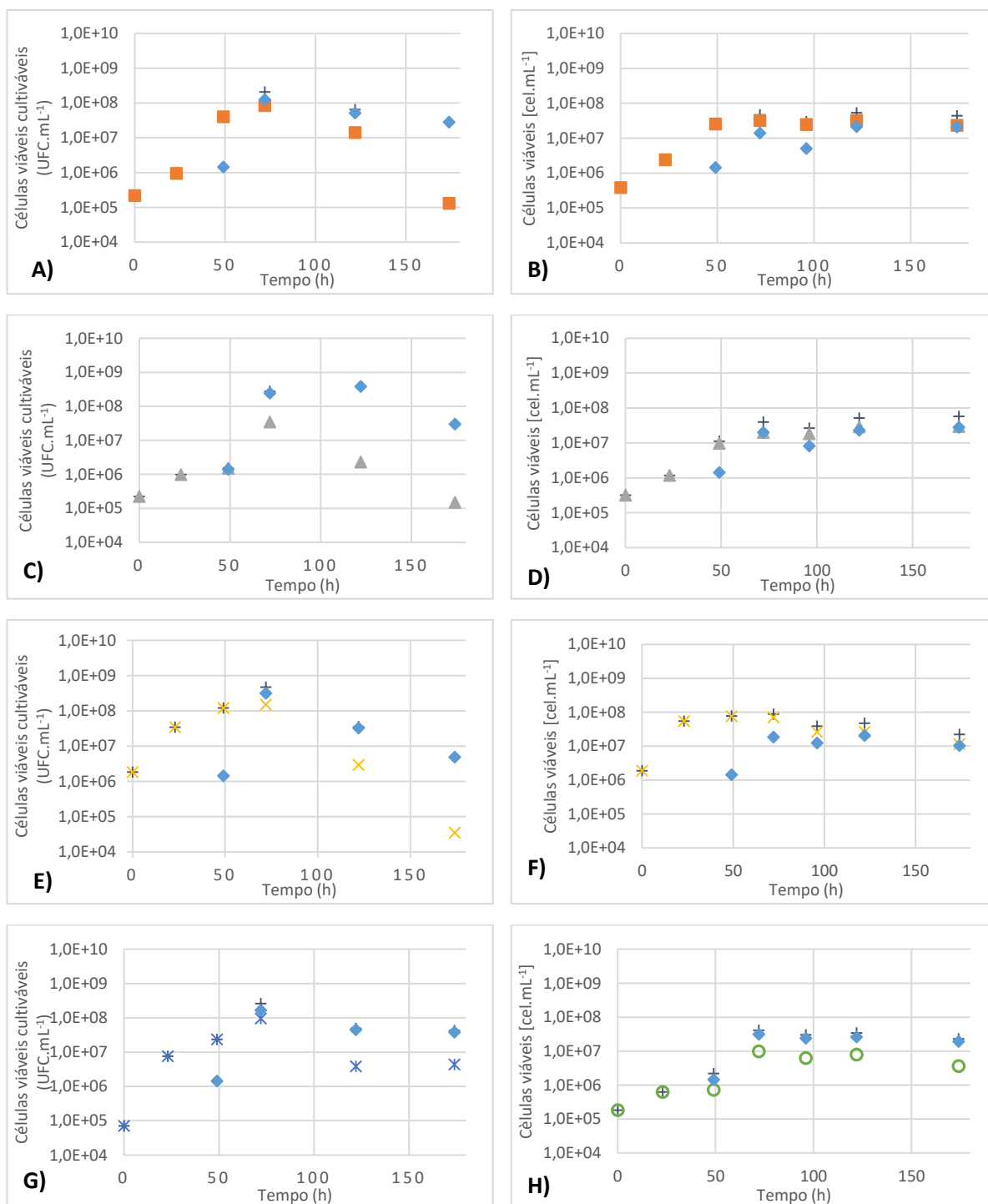


Figura 38- Curvas de crescimento de ensaios individuais em mosto Weiss. A) e B) Evolução microbiota ensaios *D. bruxellensis* DL; C) e D) Evolução microbiota ensaios *D. bruxellensis* DS; E) e F) Evolução microbiota ensaios *K. apiculata*; G) Evolução microbiota ensaio *S. cerevisiae* não-comercial P; H) Evolução microbiota ensaio *T. delbrueckii*. Símbolos: (+) Total; (◆) Co-inóculo BB; (■) DL; (▲) DS; (×) K; (*) P; (○) T.

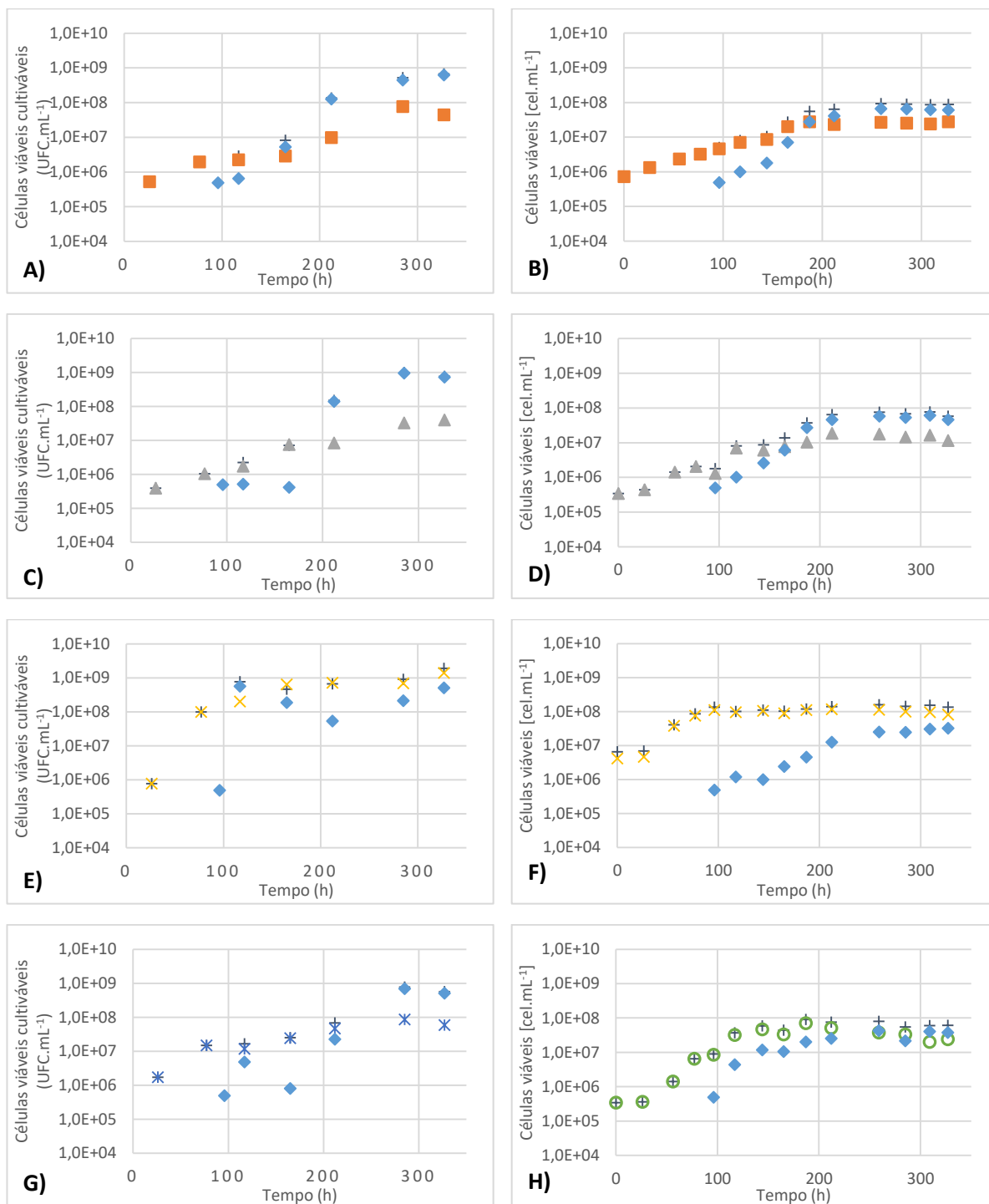


Figura 39- Curvas de crescimento de ensaios individuais em mosto Dunkel. A) e B) Evolução microbiota ensaios *D. bruxellensis* DL; C) e D) Evolução microbiota ensaios *D. bruxellensis* DS; E) e F) Evolução microbiota ensaios *K. apiculata*; G) Evolução microbiota ensaio *S. cerevisiae* não-comercial P; H) Evolução microbiota ensaio *T. delbrueckii*. Símbolos: (+) Total; (♦) Co-inóculo LB; (■) DL; (▲) DS; (×) K; (*) P; (○) T.

Anexo VIII: Aromas identificados na análise sensorial

Tabela 32- Avaliação da componente aromática das cervejas *Stout*

Cerveja	Controlo	DL	DS	K	P	T
Nº aromas*	15	19	17	25	20	25
DESCRIPTORES**	Pão	Biscoito	Biscoito	Pão	Pão	Caramelo
	Caramelo	Caramelo	Caramelo	Caramelo	Caramelo	Torrado
	Torrado	Torrado	Torrado	Torrado	Torrado	Chocolate
	Chocolate	Chocolate	Chocolate	Chocolate	Chocolate	Café
	Café	Café	Café	Café	Café	Frutado
	Herbáceo	Citrico	Citrico	Herbáceo	Frutado	Floral
		Herbáceo	Herbáceo	Pinho	Floral	Madeira
		Madeira	Fumado	Madeira	Herbáceo	Rosas
				Fumado	Pinho	Fumado
				Toffee	Madeira	Toffee
					Manteiga	Nozes
						Medicinal
	*Número de aromas distintos identificados pelo painel de provadores. **Descritores dos aromas mais evidentes em cada cerveja identificados por 20% ou mais dos provadores.					

Tabela 33- Avaliação da componente aromática das cervejas *Weiss*

Cerveja	Controlo	K	P	T
Nº aromas*	21	21	18	21
DESCRIPTORES**	Pão	Pão	Pão	Pão
	Biscoito	Biscoito	Biscoito	Citrico
	Caramelo	Citrico	Torrado	Tropical
	Citrico	Frutado	Citrico	Frutado
	Tropical	Herbáceo	Tropical	Floral
	Floral	Madeira	Frutado	Fruta verde
	Banana	Banana	Herbáceo	Banana
	Mel	Cravinho	Banana	Solvente
			Pastilha elástica	
			Medicinal	
			Vinagre	
			Baunilha	
	*Número de aromas distintos identificados pelo painel de provadores. **Descritores dos aromas mais evidentes em cada cerveja identificados por 20% ou mais dos provadores.			

Tabela 34- Avaliação da componente aromática das cervejas *Dunkel*

Cerveja	Controlo	K	P	T
Nº aromas*	18	17	20	22
DESCRIPTORES**	Pão	Pão	Pão	Pão
	Biscoito	Biscoito	Biscoito	Biscoito
	Caramelo	Caramelo	Caramelo	Caramelo
	Torrado	Torrado	Torrado	Torrado
	Frutado	Café	Café	Café
	Pinho	Citrico	Citrico	Floral
	Madeira	Pinho	Frutado	Herbáceo
	Toffee	Madeira	Pinho	Madeira
		Fruta verde	Madeira	Cravinho
		Toffee	Toffee	Fumado
		Medicinal	Mel	Toffee
			nozes	
			Queijo	
			Vinagre	
<p>*Número de aromas distintos identificados pelo painel de provadores. **Descritores dos aromas mais evidentes em cada cerveja identificados por 20% ou mais dos provadores.</p>				

Anexo IX: Aparência das cervejas produzidas.

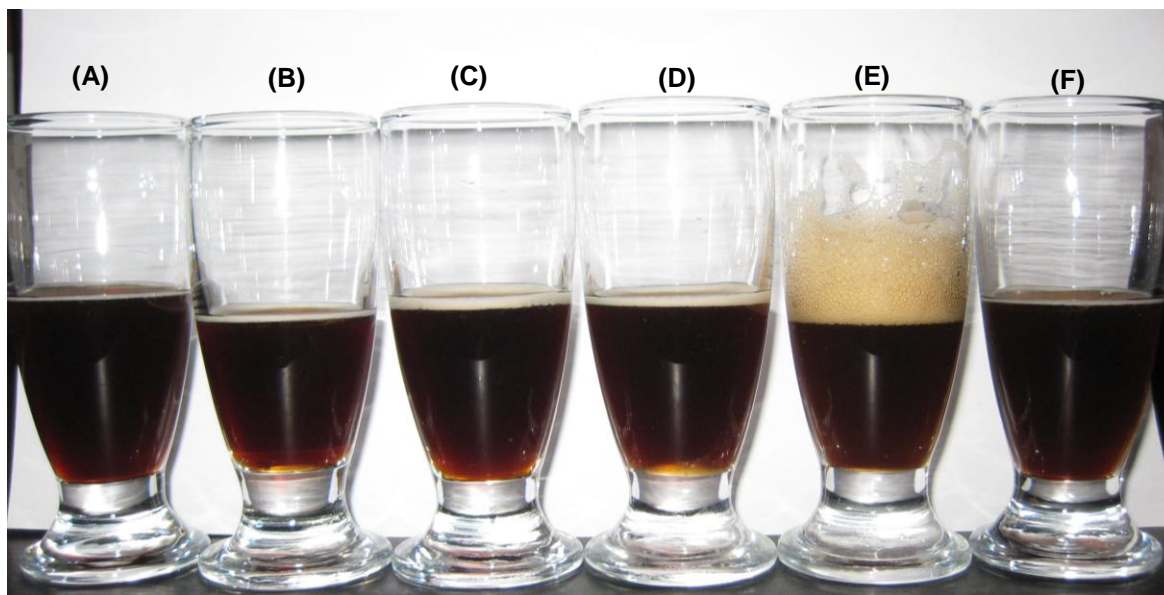


Figura 40- Aparência final dos ensaios fermentativos do estilo Stout. A) cerveja de controlo; B) cerveja co-inoculada com *D. bruxellensis* DL; C) cerveja co-inoculada com *D. bruxellensis* DS; D) cerveja co-inoculada com *K. apiculata*; E) cerveja co-inoculada com *S. cerevisiae* não-comercial P; F) cerveja co-inoculada com *T. delbrueckii*.



Figura 41- Aparência final dos ensaios fermentativos do estilo Weiss. A) cerveja de controlo; B) cerveja co-inoculada com *D. bruxellensis* DL; C) cerveja co-inoculada com *D. bruxellensis* DS; D) cerveja co-inoculada com *K. apiculata*; E) cerveja co-inoculada com *S. cerevisiae* não-comercial P; F) cerveja co-inoculada com *T. delbrueckii*.

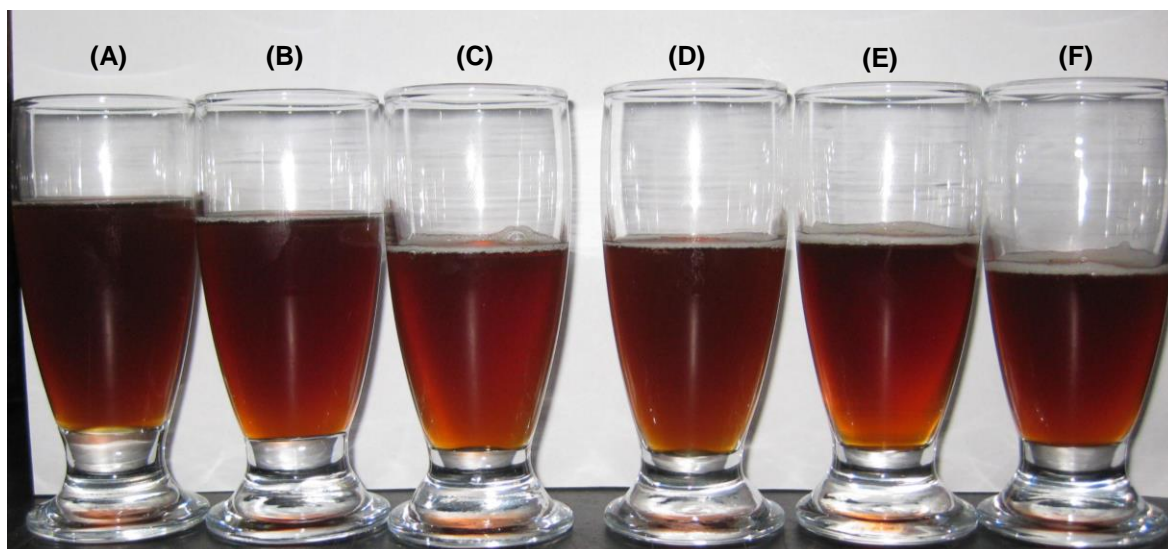


Figura 42- Aparência final dos ensaios fermentativos do estilo *Dunkel*. A) cerveja de controlo; B) cerveja co-inoculada com *D. bruxellensis* DL; C) cerveja co-inoculada com *D. bruxellensis* DS; D) cerveja co-inoculada com *K. apiculata*; E) cerveja co-inoculada com *S. cerevisiae* não-comercial P; F) cerveja co-inoculada com *T. delbrueckii*.

Anexo X: Resumo dos resultados dos ensaios fermentativos

Tabela 35- Resumo dos principais parâmetros analisados nos ensaios co-fermentados e ensaios de controle

Ensaio	Controlo			DL			DS			K			P			T		
Estilo de cerveja	<i>Stout</i>	<i>Weiss</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Stout</i>	<i>Weiss</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Stout</i>	<i>Weiss</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Stout</i>	<i>Weiss</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Stout</i>	<i>Weiss</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Stout</i>	<i>Weiss</i>	<i>Dunkel</i>
Viabilidade inicial (%)	82	93	100	72	95	82	90	84	71	89	95	64	100	67	58	67	75	63
Viabilidade final (%)	13	10	67	23	66	69	73	89	82	30	16	87	73	81	79	15	53	91
Taxa de crescimento (h ⁻¹)	0,181	0,188	0,081	0,117	0,086	0,022	0,120	0,071	0,029	0,110	0,145	0,059	0,240	0,105	0,069	0,114	0,072	0,051
Açúcares iniciais [g.L ⁻¹]	77,8	90,9	71,6	77,8	90,9	71,6	77,8	90,9	71,6	77,8	90,9	71,6	77,8	90,9	71,6	77,8	90,9	71,6
Açúcares final [g.L ⁻¹]	4,5	7,1	7,4	7,8	5,3	11,6	6,4	6,7	9,1	9,5	5,8	12,4	4,0	5,1	11,0	6,6	7,6	15,2
Atenuação (%)	94	92	90	90	94	84	92	93	87	88	94	83	95	94	85	92	92	79
Rendimento etanol (g.g ⁻¹)	0,505	0,400	0,554	0,526	0,386	0,437	0,380	0,363	0,410	0,487	0,453	0,375	0,639	0,532	0,470	0,570	0,315	0,470
Rendimento glicerol (g.g ⁻¹)	0,022	0,012	0,036	0,026	0,019	0,050	0,028	0,023	0,035	0,022	0,018	0,049	0,020	0,011	0,033	0,024	0,014	0,040
Etanol % (v/v)	4,33	4,22	4,5	4,52	4,15	3,36	3,13	3,83	3,25	4,27	4,86	2,84	6,89	5,69	3,61	4,00	3,33	3,36
Glicerol [g.L ⁻¹]	1,99	1,22	2,55	2,10	1,89	3,27	2,02	2,17	2,43	1,87	1,76	3,14	1,96	1,15	2,24	1,77	1,37	2,52
pH inicial	5,10	5,47	5,15	5,10	5,47	5,15	5,10	5,47	5,15	5,10	5,47	5,15	5,10	5,47	5,15	5,10	5,47	5,15
pH final	4,40	4,35	4,43	4,33	4,19	4,30	4,32	4,14	4,41	4,26	4,49	4,08	4,29	4,46	4,38	4,37	4,22	4,42
Ácido acético [mg.L ⁻¹]	396	1366	251	520	1995	522	610	1715	296	650	1385	673	923	795	312	360	1304	498
Ácido succínico [mg.L ⁻¹]	422	553	512	407	527	273	371	645	420	566	770	567	433	750	507	361	579	318
Ácido málico [mg.L ⁻¹]	1470	1211	1579	1279	1210	1808	1152	1398	1635	2338	1514	1933	1949	1142	1884	1116	1354	1255
Análise sensorial																		
Aparência (0-5)	3,9	4,0	3,9	4,2	-	-	3,9	-	-	3,9	3,9	4,1	3,4	3,4	3,3	4,0	4,0	3,9
Aroma (0-5)	3,4	3,8	3,3	3,7	-	-	3,4	-	-	3,8	3,4	3,3	3,0	3,4	3,2	3,3	3,4	3,7
Palato (0-5)	3,4	3,3	3	3,8	-	-	3,1	-	-	4,0	2,9	3,6	3,2	3,2	3,3	3,8	3,4	3,7
Flavour (0-5)	3,3	3,6	3,6	3,7	-	-	3,4	-	-	3,8	3,1	3,3	3,2	3,3	3,6	3,7	3,2	3,9
Drinkability (0-5)	3,6	3,9	3,7	3,7	-	-	3,4	-	-	3,8	3,6	3,6	3,2	3,1	3,8	3,7	3,4	3,9
Adequação ao estilo (%)	78	89	89	89	-	-	78	-	-	89	67	78	56	44	89	56	100	100
Intenção de compra (0-5)	3,3	3,2	3,3	3,6	-	-	3,2	-	-	3,7	2,7	3,4	2,6	2,4	3,6	4,1	3,1	3,8
Classificação geral (0-10)	6,3	6,3	6,3	6,6	-	-	6,2	-	-	7,6	5,6	6,7	5,6	5,1	6,7	7,0	6,2	7,4